

國立臺灣大學獸醫專業學院臨床動物醫學研究所

碩士論文

Institute of Veterinary Clinical Science

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

大麻二酚在光誘導視網膜退化病變模式下的神經保護

效果

Neuroprotective Effect of Cannabidiol in Experimental  
Light-induced Retinal Degeneration

黃詩婷

Shih-Ting Huang

指導教授：林中天 博士

詹東榮 博士

Advisor: Chung-Tien Lin, DVM, Ph.D.

Tong-Rong Jan, Ph.D.

中華民國 98 年 5 月

May, 2009

# 目錄

|  |    |
|--|----|
| 中文摘要.....                                    | 1  |
| 英文摘要.....                                    | 2  |
| 第一章 緒言.....                                  | 3  |
| 第一節 犬隻遺傳性視網膜疾病之更新.....                       | 3  |
| 第二節 光照與眼部病變的關連性.....                         | 3  |
| 第三節 實驗目的.....                                | 4  |
| 第二章 文獻探討.....                                | 5  |
| 第一節 視網膜退化症 (Retina atrophy) 以及目前治療策略之介紹..... | 5  |
| 第 1-1 節 視網膜退化症 (Retina atrophy).....         | 5  |
| 第 1-2 節 視網膜退化症分類.....                        | 7  |
| 第 1-3 節 視網膜退化症之臨床探討.....                     | 10 |
| 第 1-4 節 治療策略.....                            | 13 |
| 第二節 光誘導視網膜病變之動物模式.....                       | 13 |
| 第 2-1 節 簡介.....                              | 13 |
| 第 2-2 節 光誘導視網膜病變生理病理機制之探討.....               | 14 |
| 第 2-3 節 光誘導視網膜病變之評估.....                     | 18 |
| 第 2-4 節 治療策略.....                            | 24 |
| 第三節 大麻二酚 (Cannabidiol) 的簡介與應用.....           | 27 |
| 第 3-1 節 大麻生物鹼及其臨床應用潛力.....                   | 27 |
| 第 3-2 節 大麻二酚的作用機制簡介.....                     | 29 |
| 第四節 Minocycline 的簡介與臨床應用.....                | 32 |
| 第 4-1 節 Minocycline 的簡介及臨床潛力.....            | 32 |
| 第 4-2 節 Minocycline 的神經保護機制簡介.....           | 33 |
| 第三章 實驗材料與方法.....                             | 36 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 第一節     | 實驗動物 .....                              | 36 |
| 第二節     | 光誘導視網膜病變之大鼠模式 .....                     | 36 |
| 第三節     | 實驗材料與分組 .....                           | 36 |
| 第四節     | 藥物的劑量與投予 .....                          | 37 |
| 第五節     | 視網膜電波圖之紀錄與分析 .....                      | 38 |
| 第六節     | 組織病理學切片評估 .....                         | 39 |
| 第七節     | 微膠細胞 (Microglia cell) 免疫組織化學染色評估 .....  | 39 |
| 第四章     | 實驗結果 .....                              | 42 |
| 第一節     | 視網膜電波圖之分析結果 .....                       | 42 |
| 第 1-1 節 | 視網膜電波圖 a 波之分析結果 .....                   | 42 |
| 第 1-2 節 | 視網膜電波圖 b 波之分析結果 .....                   | 47 |
| 第二節     | 組織病理學切片評估 .....                         | 50 |
| 第 2-1 節 | 視網膜各層厚度之分析比較 .....                      | 50 |
| 第 2-2 節 | 視網膜型態之檢查結果 .....                        | 60 |
| 第三節     | 微膠細胞 (Microglia cell) 免疫組織化學染色之分析 ..... | 62 |
| 第五章     | 討論 .....                                | 67 |
| 第一節     | 光誘導視網膜退化大鼠模式之建立 .....                   | 67 |
| 第二節     | 神經保護藥物的選擇 .....                         | 68 |
| 第三節     | 大麻二酚的藥效評估 .....                         | 70 |
| 第六章     | 結論 .....                                | 81 |
| 第七章     | 參考文獻 .....                              | 82 |

## 摘要

遺傳性視網膜退化症無論在人還是犬隻，到目前為止尚未有有效的方式可以治癒，近年來的研究發現主要為視網膜感光細胞凋亡所造成，同時可能與微膠細胞(microglia cells)過度活化有關。本研究利用光照曝露的方式誘導 Sprague-Dawley 大鼠的視網膜病變，建立視網膜感光細胞凋亡的動物模式，用以研究遺傳性視網膜退化症的病變，同時進行嘗試性的藥物治療，以供未來臨床治療上的另一考量。

本研究中選擇的藥物大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 於之前的研究中曾被指出具有抗氧化、抗發炎、以及神經保護的效果，並選擇已被發表於相同模式下具由神經保護效果的 minocycline 來做比較。在研究中利用視網膜電波圖以及組織病理的型態變化來評估其具有的神經保護效果，此外進一步探討大麻二酚與微膠細胞的活化關係，藉此確認大麻二酚達到神經保護效果的機制。結果發現以光誘導視網膜病變的治療對照組在視網膜電波圖檢測下，比起正常大鼠有顯著的 a 波以及 b 波的振幅下降。組織病理檢查發現治療對照組之視網膜的外核層以及感光細胞層厚度顯著的減少，同時外核層的細胞排列鬆散、並呈現空洞化。在免疫組織化學染色偵測下發現，治療對照組在視網膜的外層有明顯的微膠細胞活化。研究發現大麻二酚在視網膜電波圖以及組織病理的評估下，皆能減緩光誘導之視網膜病變，並且抑制微膠細胞的活化，比起治療對照組有顯著差異。因此認為大麻二酚具有神經保護效果。但在臨床上對於視力的實際保護效力未來仍需要更進一步的評估。

## Abstract

Inherited retinopathy, progressive retinal atrophy (PRA), is a group of common inherited retinopathies in dogs. There is no treatment for inherited retinopathy to date. Loss of vision cells by apoptosis is a key feature of PRA. Microglia cells have been believed to play an important role in neurodegenerative diseases. Light-induced retinal degeneration has been a good experimental model to study the pathophysiology and therapeutic modalities in photoreceptor-led retinal degeneration. The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effect of cannabidiol (CBD) to investigate whether CBD can ameliorate light-induced retinal degeneration. Sprague-Dawley rats received an intraperitoneal injection of CBD, minocycline or vehicle 12 hours before exposure to white light. Morphologic, immunohistochemical, and scotopic electroretinograms were performed to evaluate the effect of CBD and the possible involvement of microglial cells. After exposure to light scotopic electroretinography showed that both the amplitude of a- and b-wave significantly reduced of the vehicle-treated group. Retinal histology revealed that the outer nuclear layer and outer segment of the retina were significantly decreased in vehicle-treated group, and OX42-positive microglia occurred in the ONL and subretinal space. The CBD-treated group showed markedly better preservation of retina electrophysiologically and morphologically after light damage, and significantly reduced the number of OX42-positive microglia than the vehicle-treated group. CBD may process neuroprotective effect against photoreceptor degeneration following light exposure based on this study, and possibly through the inhibition of retinal microglial activation.

## 第一章 緒言

### 第一節 犬遺傳性視網膜疾病之更新

犬隻的遺傳性視網膜病變，或統稱視網膜萎縮症 (retinal atrophy) 目前已證實有超過 100 多個犬種的犬隻帶有此疾病的缺陷基因，此類疾病的缺陷基因在不同犬種常不同。但是不論缺陷基因為何，臨床症狀皆很類似，在疾病的初期可能只是夜間視力的退化，但是隨著疾病惡化則會漸進性的日間視力減退，最後嚴重到導致全盲。在人類亦有類似的遺傳性視網膜病變，稱為視網膜色素變性 (retinitis pigmentosa, RP)。遺憾的是，犬隻遺傳性視網膜病變儘管被證實以及探討幾十年的時間，但在治療方面仍僅有少數成功個案。目前多靠基因的篩檢以及配種淘汰來減少帶有突變基因的犬隻數量。在人類有不斷的嘗試包括基因治療、視網膜移植以及一些神經保護藥物，至今也有許多具有不錯療效的報導(Souied *et al.*, 2008)。

### 第二節 光照與眼部病變的關連性

近年許多研究已經證實日常生活中的可見光以及不可見光 (例如紫外線) 的累積都有可能對眼睛造成傷害，其傷害的部份包括眼角膜、水晶體以及視網膜，例如連續曝露在可見光之下可能造成人類視網膜的疾病像是老年黃斑病變 (age-related macular degeneration, AMD) (Wenzel *et al.*, 2005)。在實驗動物上利用過多的光照累積可以協助我們在短時間內觀察到大量凋亡的細胞，由於不管是人類或是犬隻的遺傳性視網膜病變主要都是因為視網膜感光細胞的凋亡死亡 (apoptosis) 而造成，因此了解感光細胞凋亡的變化有助於探討這些疾病。因此利用過度光照曝露所建立的實驗動物模式不但可以減少研究遺傳性視網膜病變的困難性，也適合當作嘗試性治療遺傳性視網膜病變的模式。

### 第三節 實驗目的

本研究的目的是在於利用可見光誘導造成實驗大鼠的視網膜病變，以建立視網膜感光細胞凋亡的模式，藉以模仿許多遺傳性視網膜感光細胞死亡的疾病，例如犬隻常見的漸進性視網膜退化症 (progressive retinal atrophy, PRA)，除此之外利用這個動物模式進行嘗試性的藥物治療。治療方面則是選擇在實驗上曾被報導具有抗氧化、抗發炎免疫以及神經保護效果的藥物大麻二酚 (cannabidiol)，並使用已被研究發表在光誘導實驗大鼠的視網膜病變模式下，具有神經保護的藥物 minocycline 來做效果的比較。

評估方法藉由視網膜電波圖 (electroretinography, ERG) 來檢查視網膜電生理以及功能性的變化；另外評估視網膜的組織病理變化以了解大麻二酚對於視網膜神經細胞的保護效果。



## 第二章 文獻探討

### 第一節 視網膜退化症 (retinal atrophy) 以及目前治療策略之介紹

#### 第1-1節 視網膜退化症

犬隻視網膜的退化 (canine retinal degeneration) 首次於 1911 年由 Madnusson 等人提出完整的相關報導，至今已被證實超過 100 多種的犬種基因會因為突變而患有不同型態的視網膜退化，是一種遺傳性的視網膜病變。其突變之下的蛋白質主要會影響兩個視覺傳導的途徑，如圖 1-1 所示，此途徑為光傳導過程 (phototransduction cascade)，為光子打到視網膜外層之感光細胞層後，再將電子訊號傳達至內層的視網膜，經視神經傳達至腦部；另一途徑如圖 1-2 所示，為視覺循環 (visual cycle)，這部份為光子尚未達到感光細胞層前，位於色素上皮細胞內的 11-cis-retinal 會和經過桿狀外層光傳導途徑之後轉變為 opsin 以及 all-trans-retinal 的 rhodopsin 結合，之後 all-trans-retinal 再轉變為 all-trans-retinol 回到視網膜色素上皮區域，最後經由 RPE65 再回復為 11-cis-retinal (Petersen-Jones *et al.*, 2005)。

此種疾病的特徵為發病初期發生夜間視力的退化，之後是漸進性的日間視力下降直到最後的全盲，因此又名為漸進性視網膜退化症 (progressive retinal atrophies, PRAs)。此疾病在犬隻是自然發生的視網膜病變，除此之外其表型也與人的色素視網膜炎非常相似 (Maggs *et al.*, 2008)。



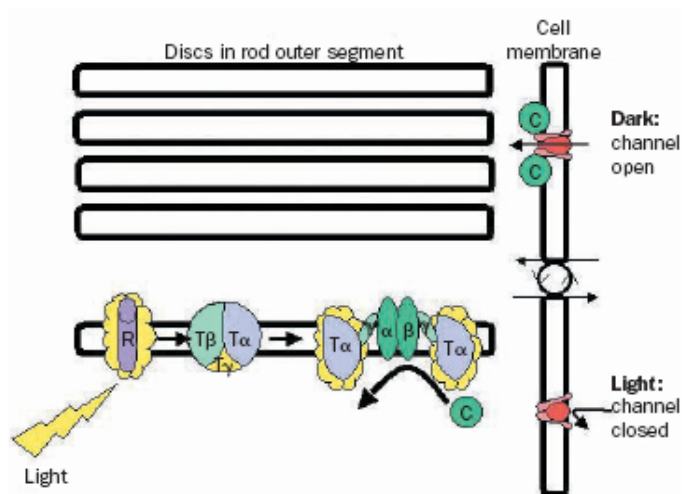


圖 1-1. 發生於視網膜外核層桿狀細胞的光傳導途徑簡化圖。

在外層的細胞膜上具有 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) -gated channel 來做細胞的調節，在黑暗期，大多數的通道會開啟並且使細胞去極化；相對的在光照的刺激下會使 cGMP 水解並且減少，使細胞回復再極化的現象。(Petersen-Jones *et al.*, 2005)

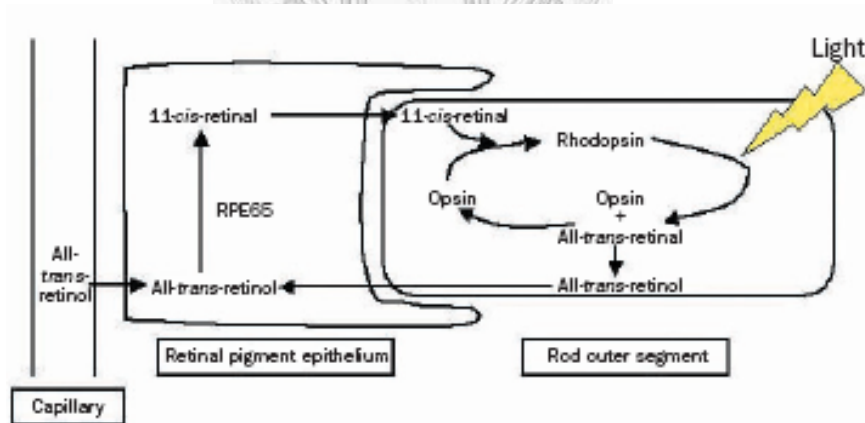


圖 1-2. 視覺循環簡化圖。

視覺循環主要包括 11-cis-retinal 的形成，同時會和經過桿狀外層光傳導途徑之後轉變為 opsin 以及 all-trans-retinal 的 rhodopsin 結合，之後 all-trans-retinal 再轉變為 all-trans-retinol 回到視網膜色素上皮區域，最後經由 RPE65 再回復為 11-cis-retinal。(Petersen-Jones *et al.*, 2005)

## 第1-2節 視網膜退化症分類

犬隻視網膜退化症一般來說可以粗分為早期發病 (early-onset)、中期發病 (mid-onset) 以及晚期發病 (late-onset) 三大類型式。其中早期發病的疾病,例如 rod-cone dysplasia (rcd)認為是發育性(developmental)的問題,主要因為基因上的缺陷導致在出生之後的視覺細胞(包括桿狀感光細胞和椎狀感光細胞)分化過程中有發育不良的現象,通常發生在約 10 週齡的犬隻,在這些犬隻會發生嚴重的桿狀細胞結構改變以及椎狀細胞逐漸惡化的傷害;中期發病的疾病,例如迷你長毛臘腸犬的 cone-rod degeneration (crd)認為是退化性的問題,通常發生在 6 月齡至三歲大的犬隻。主要是因為帶有突變基因的犬隻在視覺細胞分化正常之後才出現漸進性的桿狀以及椎狀細胞的退化;晚期發病的疾病,例如漸進性桿狀及椎狀細胞的退化 (progressive rod-cone degeneration, PRCD),亦屬於退化性 (degenerative) 的問題,此疾病同時也是常見的遺傳性視網膜退化疾病之一。通常在超過 3 歲齡或 4-7 歲的犬隻被診斷出來,目前發現包括 20 幾個犬種帶有此疾病,包括迷你貴賓、玩具貴賓、以及拉不拉多犬等(Petersen-Jones *et al.*, 1998)。特別的是,晚期發病的形式其視網膜退化的速度比起早期發病來的緩慢(Petersen-Jones *et al.*, 2005)。

此外根據視網膜分子病變分為兩種類型:全面性的漸進性視網膜退化症 (generalized PRA, gPRA),即在此疾病的末期其視網膜呈現全面性的高度反光 (hyperreflectivity);另一種則是中心型漸進性視網膜退化症 (central PRA, CPRA),此類型病變特色為在視網膜上呈現多區域的高度反光,同時最先影響在視網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE),因此此種類型通常不會造成全盲的臨床症狀,CPRA 已被更名為視網膜色素上皮失養症 (retinal pigment epithelial dystrophy, RPED),來

與 gPRA 區分。

目前漸進性視網膜退化症根據不同基因以及病理變化造成其變異性很大，同時不同的犬種之間發生漸進性視網膜退化症的年紀也有所差異，因此到目前為止沒有辦法做出非常明確的分類。參考表 1-1 整理出主要的犬種、發生年紀以及受影響的基因：其中顯性的漸進性視網膜退化症是高度異種遺傳性，其中包含許多轉譯的突變以及大量基因的突變，因此只發生在少數的品種；而在性染色體上突變（X-linked PRA）造成的漸進性視網膜退化症目前只有在兩個犬種被發現。



| BREED                              | CONDITION NAME                       | SYMBOL       |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| <b>EARLY-ONSET DISEASE</b>         |                                      |              |
| Alaskan malamute                   | Cone degeneration (hemeralopia)      | <i>cd</i>    |
| Belgian shepherd                   | Photoreceptor dysplasia              | —            |
| Bernese mountain dog               | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Briard                             | Retinal dystrophy                    | —            |
| Bull mastiff                       | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| Cardigan Welsh corgi               | Rod-cone dysplasia 3                 | <i>rcd3</i>  |
| Collie (rough and smooth)          | Rod-cone dysplasia 2                 | <i>rcd2</i>  |
| Coton de Tulear                    | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| Dachshund (miniature long haired)  | Cone-rod degeneration 1              | <i>crd1</i>  |
| Dachshund (standard wirehaired)    | Cone-rod degeneration                | <i>crd</i>   |
| Douge de Bourdeaux                 | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| French mastiff                     | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| German shorthaired pointer         | Cone degeneration (hemeralopia)      | <i>cd</i>    |
| Great Pyrenees                     | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| Irish setter* (red and white)      | Rod-cone dysplasia 1                 | <i>rcd1</i>  |
| Mastiff (old English)              | Canine multifocal retinopathy        | CMR          |
| Norwegian elkhound                 | Rod dysplasia                        | <i>rd</i>    |
| Pit bull terrier                   | Early rod degeneration               | <i>erd</i>   |
| Schnauzer* (miniature)             | Cone-rod degeneration 2              | <i>crd2</i>  |
|                                    | Type A–progressive retinal atrophy   | Type A–PRA   |
| <b>LATE-ONSET DISEASE</b>          |                                      |              |
| Akita                              | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| American cocker spaniel            | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| American Eskimo                    | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Australian cattle dog*             | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Australian shepherd                | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Australian stumpy tail cattle dog* | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Bull mastiff                       | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Chesapeake Bay retriever           | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Chinese crested*                   | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Cockapoo                           | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| English cocker spaniel             | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Entlebucher mountain dog           | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Finnish Lapphund*                  | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Golden retriever                   | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Kuvasz                             | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Labrador retriever                 | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Lapponian herder*                  | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Mastiff (old English)              | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Nova Scotia duck-tolling retriever | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Papillon                           | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Poodle* (miniature and toy)        | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Portuguese water dog               | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Samoyed                            | X-linked progressive retinal atrophy | XLPR         |
| Schapendoe                         | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Siberian husky                     | X-linked progressive retinal atrophy | XLPR         |
| Sloughi                            | Rod-cone degeneration 1a             | <i>rcd1a</i> |
| Spanish water dog                  | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Swedish Lapphund*                  | Progressive rod-cone degeneration    | <i>prcd</i>  |
| Tibetan spaniel                    | Progressive retinal atrophy          | PRA          |
| Tibetan terrier                    | Progressive retinal atrophy          | PRA          |

表 1-1. 遺傳性視網膜病變的分類。(Maggs *et al.*, 2008)

### 第1-3節 視網膜退化症之臨床探討

不論是哪一種類型漸進性視網膜退化症，表現出來的臨床症狀都非常類似，一般來說在疾病發生初期會出現在暗室或是微量燈光的環境下視力不良的情況，此時可以藉由在微量燈光環境下進行威嚇反應

(menace test) 或是棉花球掉落測試來檢查暗室下視力狀況，除此之外由於視網膜厚度的減少，此時利用眼底鏡 (ophthalmoscopy) 可以發現明朗毯 (tapetum) 的反光改變或出現高度反光 (hyper-reflectivity)，除此之外在疾病初期亦可能見到明朗毯的血管輕度萎縮，視網膜肉眼下病變如圖 1-3、圖 1-4。近年來研究更發現視網膜的高度反光表現會先出現在視網膜中央區，尤其是視神經頭周圍(Kijas *et al.*, 2002)。隨著疾病的惡化，視力狀況會逐漸的由夜盲惡化成全盲，同時瞳孔對光的反射變弱，而且瞳孔大小會比正常狗來的大；眼底檢查狀況下則會發現血管萎縮程度更加明顯，同時明朗毯高度反光的狀況會更加明顯並逐漸包含整個明朗毯的視網膜，此外非明朗毯 (nontapetal fundus) 也可能出現去色素化 (depigmentation) 的現象，而在視神經盤 (optic disc) 的部分也會變的蒼白。

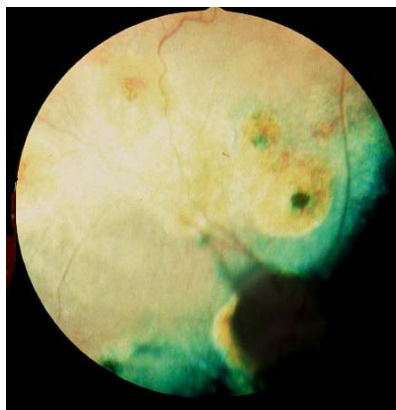


圖 1-3. 有多處的明朗毯高度反光，除此之外視神經盤顏色變的較灰，視網膜的血管也逐漸消失不明顯。



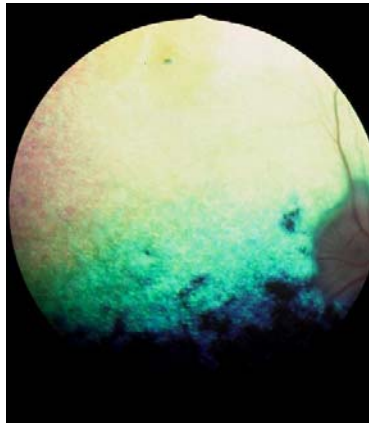


圖 1-4. 明朗毯出現高度的反光，此外視神經盤的周圍呈現灰色，視網膜的血管大多消失無法見到。

除了上述的臨床症狀可以協助判別是否為漸進性視網膜退化症以外，藉由下列的檢查可以更有效的診斷出此疾病：

- (1) 視網膜電波圖 (electroretinography; ERG)：主要利用一個光源的刺激，來評估整個視覺系統中每個部位的電位改變，因此可以有效且不侵入性的評估視網膜的功能。典型的視網膜電波圖形如圖 1-5，其中在視網膜電波圖中所呈現的 a 波為感光細胞 (photoreceptor) 中椎狀細胞以及桿狀細胞經過光刺激所產生的電位改變；b 波則是由穆勒氏細胞 (Muller cells) 以及雙極細胞 (bipolar cells) 形成鉀離子的流動而去極化所產生的電位改變；c 波則是來自於視網膜色素上皮層 (pigment epithelium) 的電位改變 (Narfstrom *et al.*, 2002)。因此藉由視網膜電波圖可以得知其視網膜的功能是否成熟之後漸進性的退化，或是視網膜在發展過程中便產生異常，除此之外也可以得知光傳導的途徑是否有異常。在多數犬隻利用視網膜電波圖檢測可以在尚未有嚴重臨床症狀之前就發現異常波形，可以說是非常有效且敏銳的早期診斷工

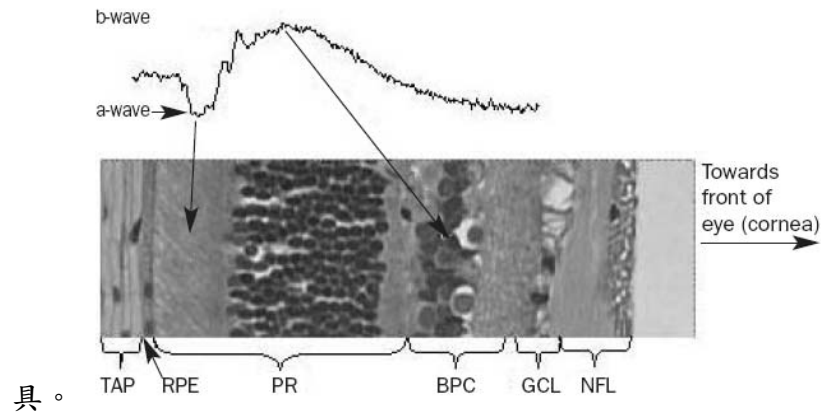


圖 1-5. 正常犬隻視網膜電波圖波型與視網膜橫切對照示意。

箭頭分別代表來自感光細胞的 a 波，以及來自內層視網膜的雙極細胞 (bipolar cells) 以及穆勒氏細胞 (Muller cells) 所形成的 b 波。TAP : Tapetum, RPE : Retinal pigment epithelial, PR : Photoreceptor, BPC : Region of bipolar cells, GCL : Ganglion cell layer, NFL : Nerve fiber layer。 (Petersen-Jones *et al.*, 2005)

- (2) 組織病理學診斷：在疾病發生的初期藉由組織學的檢查可以得知是何種視網膜細胞受到影響，或是視網膜在發育過程中是否有異常。除此之外藉由免疫組織化學染色也可以進一步的偵測特定的視網膜細胞。
- (3) 基因檢測：目前已有公司可以檢測超過 30 種犬種的去氧核糖核苷酸以篩檢是否患有遺傳性視網膜病變，這項檢測的優點在於無論犬隻的年紀大小皆可進行，同時準確率為 100%，除此之外也可以檢測出異質結合突變體 (heterozygous mutation) 的帶原者，即帶有突變基因但表型正常的犬隻。

## 第1-4節 治療策略

至目前為止，並沒有有效的治療方式可以治癒犬隻漸進性視網膜退化症。由於在人也有類似的遺傳性視網膜疾病，目前已有相關研究包括進行基因治療、視網膜的移植、幹細胞的治療、神經保護的治療方式以及營養的補充，甚至是人工視網膜等來嘗試治療漸進性的視網膜退化症。

## 第二節 光誘導視網膜病變之動物模式

### 第2-1節 簡介

許多喪失視力的疾病像是人的視網膜色素變性、老年性黃斑部病變 (Age-Related Macular Degeneration, AMD) 及一些其他的視網膜疾病，主要是因為視網膜感光細胞死亡所造成，進一步的研究則發現這些感光細胞是經由細胞凋亡作用 (apoptosis) 而造成細胞的死亡喪失，因此了解感光細胞凋亡的變化有助於探討這些疾病。一直以來有許多實驗動物模式在於研究保存視力的方法，但是較少有實驗動物的模式可以在短時間內造成細胞的死亡，除此之外，部分由遺傳疾病誘發的細胞死亡模式可能會無法顯示遺傳性細胞凋亡的機制。

因此在 1966 年由 Noell 首次提出以實驗大鼠進行光誘導造成感光細胞凋亡的模式，光照雖然是形成視覺不可或缺的條件，但同時光照也會對感光的器官形成傷害，尤其過多的光照會誘使細胞的凋亡死亡 (Noell *et al.*, 1966; Gordon *et al.*, 2002)，而這些病理變化主要是這些組織對於不同光照的穿透力因而吸收光的能量所造成的。除此之外 Noell 提出的光誘導視網膜病變的模式屬於一種光化學的傷害 (photochemical



damage)，而非光熱能的傷害（*photothermal damage*），主要是因為此模式的光照強度低於光熱能造成視網膜傷害的閾值(Wu *et al.*, 2006)。同時這種藉由外源性的刺激來誘導感光細胞的凋亡，屬於非遺傳性的模式，並且可以觀察到感光細胞生理上以及病理上的變化。

利用過多光照曝露誘發感光細胞凋亡的實驗模式具有下列幾個優點：(1) 利用光曝露造成的細胞凋亡狀況非常同步，適合用來探討不同階段的凋亡變化或是影響。(2) 利用光誘導造成視網膜細胞退化會比其他模式來的快速。(3) 根據光照曝露的強度以及時間的不同會造成不同程度的視網膜傷害。(4) 目前許多研究證實在許多視網膜疾病中，光照似乎是共同影響的因子(Noell *et al.*, 1966; Wenzel *et al.*, 2005)。

一般來說利用光照造成視網膜細胞傷害又分為兩種形式：第一型傷害主要曝露相較之下較短的時間的光照（約 48 小時），此型主要是造成感光細胞以及色素上皮的傷害；第二型傷害主要曝露在較長時間但較低強度的光照，此型主要造成感光細胞瀰漫性的傷害，但可保存色素上皮的功能 (Noell *et al.*, 1980；Malik S *et al.*, 1986)。

## 第2-2節 光誘導視網膜病變生理病理機制之探討

由光誘導造成視網膜傷害的機制並非因為熱傷害所造成，而是經過光照之後刺激光活化的物質（*photoactive molecules*）來形成原發或是二次性的視網膜傷害。而光誘導造成感光細胞退化主要經由多個階段進行：

(1) 誘導期（*induction-phase*）：正常視覺循環之下視紫質（*rhodopsin*）

會吸收光子，此時 *11-cis retinal aldehyde* 會形成 *11-trans retinal aldehyde*，之後利用酵素將反式視網膜回復成原本形式。在過多的光照下，視紫質的再生速率會增加且產生過多的代謝產物（包括

retinoid)，而這些產物可能對感光細胞有害 (Saari et al., 1998)。

(2) 死亡訊息傳遞期 (death-signal transduction-phase I)：過多的光照曝露會導致氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase; NOS) 的活化，因而製造氧化氮 (nitric oxide; NO) 以及活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS)，目前已經證實這些自由基會造成組織傷害的結果 (Wu et al., 2006)，此外進一步活化 guanylate cyclase 並使 cGMP 增加，接著使 cGMP 調控的離子通道打開，使視網膜細胞內的鈣離子濃度升高。在之前研究中也證實許多神經細胞在死亡期其細胞內的鈣離子濃度會上升 (Donovan et al., 2001)。除此之外在這個階段還包含了轉錄因子 AP-1 的活化。

(3) execution phase：在這個階段中確實機制尚未清楚，可能包括 caspase 的參與，除此之外，還有 proteolytic systems 像是 proteasomes 的參與 (Wenzel et al., 2005)。

(4) 終止期 (termination phase)：經過一連串反應之後造成 DNA 的分裂致使細胞的凋亡，同時也會吸引許多巨噬細胞前來清除死亡的細胞 (Gordon et al., 2002)。

除此之外，近年來的研究發現，連續的光照曝露會造成視網膜內的微膠細胞 (microglia cells) 的活化，並在視網膜的炎症反應中扮演重要的角色，進一步造成感光細胞的凋亡 (Ng & Streilein et al., 2001; Zhang et al., 2005)。微膠細胞是中樞神經系統一種獨特的膠狀細胞 (glial cell)，約佔所有膠狀細胞的 5%~20%，其角色等同於一般組織中的巨噬細胞 (macrophages)。一般來說微膠細胞是處於休息狀態，當有神經元受傷的時候，微膠細胞會受到活化並且迅速的遷移至受傷處，活化後的微膠細胞在型態上會增加分支並且表現出漿膜受體 (plasma membrane receptors) 使其利於與病變物質進行反應，同時亦具有傳達訊息以及移

除死亡細胞的功能(Gebicke-Haerter *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2003)。在表 2-1 也列出，受到活化的微膠細胞會分泌具有溶解或是與細胞膜接合的細胞激素，包括 IL-1 $\beta$ 、組織壞死因子 (tissue necrosis factor; TNF- $\alpha$ ) 以及活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS) 等，這些細胞激素在組織修復以及回復時具有調節以及持續免疫反應進行的功能，但是過多或是持續的微膠細胞活化會產生過多的細胞激素，因而造成持續的炎症反應而使病變更為嚴重或是造成組織的損傷(Yang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008)。有研究發現在大腦受到創傷之後會形成炎症反應，此時從活化的微膠細胞或是巨噬細胞釋放出活性氧分子、氧化氮 (nitric oxide; NO) 以及像是 TNF- $\alpha$  等物質，因而造成神經的退化(El-Remessy *et al.*, 2008)。

在正常的視網膜中有未活化的微膠細胞的存在，主要位於神經節層 (ganglion layer) 以及內叢狀層 (inner plexiform layer)。在先前文獻發現，當光照造成視網膜傷害時，微膠細胞會經由血管由原本的位置朝視網膜的外層 (outer segment; OS) 以及視網膜下層 (subretinal layer) 移動，因此認為視網膜的退化可能與微膠細胞的活化有相關性。有一篇研究進一步指出遷移的微膠細胞會隨時間而增加，主要和感光細胞凋亡所相關(Zhang & Lei *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2008)。

| Trigger            | Signaling pathway | Released         |
|--------------------|-------------------|------------------|
| ATP                | p38/ ERK          | TNF $\alpha$     |
|                    | JNK/ERK/p38       | TNF $\alpha$     |
|                    |                   | IL-1 $\beta$     |
|                    | p38/ PKC          | IL-6             |
|                    | ERK/ p38/ PI3K    | Free radicals    |
|                    | PKC/ MAPK         | TGF- $\beta$     |
|                    |                   | LIF              |
|                    |                   | Plasminogen      |
| TNF $\alpha$       |                   | TGF- $\beta$     |
| IL-6/ TNF $\alpha$ |                   | IL-10            |
| TNF $\alpha$       | PKC               | O $_2^{\cdot -}$ |
| IL-1 $\beta$       |                   | TNF $\alpha$     |
| Glutamate          | p38               | PGE2             |
| Substance P        |                   | IL6/ PGE2        |
|                    |                   | TBX              |
|                    |                   | ◦ PGE2/ EAA      |

表 2-1. 已被證實具有活化中樞系統中微膠細胞的因子，以及微膠細胞活化之後會釋出的因子。(McMahon *et al.*, 2005)

### 第2-3節 光誘導視網膜病變之評估

許多研究已經證實連續曝露在光照之下會造成成年視網膜嚴重的傷害，而這些傷害的嚴重程度又與下列幾點有關：

- (1) 光照曝露的時間：研究證實曝露時間越長，造成視網膜的傷害越嚴重，Moriya 等人證實若是曝露在光照的時間沒有超過 12 小時，則受傷害的感光細胞有可能會回復(Moriya *et al.*, 1986)。除此之外還會有光照的累積傷害 (cumulative effect)，Noell 等人發現曝露 3 至 4 次各 5 分鐘，同時中間各間隔 1 小時暗室所形成的光照傷害，比起單次光照 5 分鐘的視網膜傷害還來的嚴重。Organisciak 等人也證實在大鼠模式下間隔的光照曝露比起連續的光照曝露造成的感光細胞傷害更為嚴重(Organisciak *et al.*, 1989)。
- (2) 光照的強度：一般都認為此種光化學的傷害與受到光照的總量有關，O'steen 等人也證實視網膜的退化速度與光照的強度有關，此外越強的光照會造成色素上皮細胞越嚴重的病變(O'Steen & Anderson *et al.*, 1972)。
- (3) 光照的波長：之前研究中發現，在波長 380 nm 的光照曝露下會造成感光細胞尤其是桿狀細胞的傷害，而在波長 470 nm 的光照下則會造成感光細胞以及色素上皮的傷害。除此之外 Grimm 等人也發現曝露在藍光之下的視網膜病變會比曝露在綠光下的視網膜病變來的嚴重(Grimm *et al.*, 2001)。
- (4) 光照的形式：Noell 等人發現以大鼠實驗模式在進行光照傷害之前先給予暗室適應期，所造成的視網膜病變會更加嚴重。這是因為在暗室環境下動物體會增加視網膜中視紫質的數量，也因此對於光誘導的傷害更具感受性。反之，若是在光照傷害之前將動物飼養於週期性的微弱燈光環境下，則會減少對於光照的感受性(Wu *et al.*,

2006)。

(5) 實驗動物的年紀：O'steen 等人以不同年紀的實驗動物進行光照傷害的比較，發現年紀越大造成視網膜的病變越嚴重，這是因為在幼年的動物除了感受性較低以外，傷害之後再生的能力也較強(O'Steen *et al.*, 1974)。

(6) 光敏感藥物、飲食狀況以及動物的品種也會對光誘導視網膜病變具有影響(Gordon *et al.*, 2002)。

由於此模式的傷害是藉由視紫質開始傳達，因此初始造成的傷害會出現在感光細胞的外層。之前的文獻提到在可見光光照下曝露一個小時便可在電子顯微鏡下觀察到感光細胞的退化(O'Steen *et al.*, 1972)，除此之外也可以觀察視紫質的數量；除了結構上的改變以外，也可以藉由視網膜電波圖來進行視網膜功能性的評估。

#### A. 組織病理學評估

由於光誘導視網膜的病變主要經由視紫質傳導，因此視網膜的外層的傷害最為嚴重，在傷害初期，首先會造成色素上皮的細胞腫脹以及染色質濃縮，代表在傷害初期除了視覺細胞以外，色素上皮也同時受到嚴重的影響。接著傷害後期，視覺細胞的傷害逐漸明顯，在之前文獻提到，在光曝露之後的第六個小時可以明顯見到凋亡數目增加，此外視覺細胞層形成皺摺並且充滿液體；Specht 等人也發現連續曝露在光照之下 24 小時會見到大約 10% 的桿狀細胞遺失，若是連續曝露長達 14 天之後則會失去大約 40% 的桿狀細胞(Specht *et al.*, 1999)。而在視網膜內層 (inner layer) 的部分相較之下可能僅有少許細胞水腫，但是大多可以有良好的保存。到了傷害最終，則是視覺細胞層以及色素上皮完全的消失。除此之外，研究中也發現較靠近鼻側的視網膜比起顛側的視網膜傷害來的更嚴重，同時最嚴重的傷

害區域也並非位於中央區域，因此認為對於光照有感受性的細胞並非均勻的分布於視網膜(Noell *et al.*, 1966)。

此外，Cicerone 等人發現在大鼠模式中，桿狀細胞比起椎狀細胞對於光照造成的傷害更具感受性(Cicerone *et al.*, 1976);而 Lawwill 等人則是在兔子模式下發現在曝露 4 個小時光照之後，其傷害在感光細胞密度最高的區域最為嚴重，同時若增加曝露時間，則傷害除了發現在感光細胞以外還會蔓延至色素上皮層(Lawwill *et al.*, 1973)。因此，光誘導造成視網膜型態上的傷害在不同種別的動物之間會有所差異，同時傷害程度也會與曝露程度有關(Wu *et al.*, 2006)。

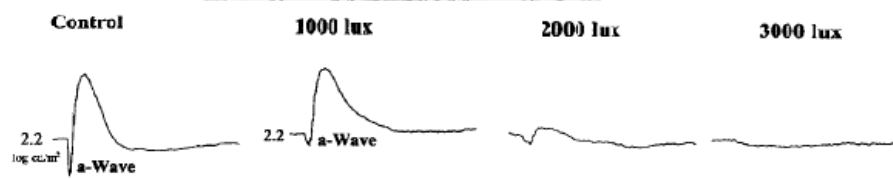
#### B. 視網膜電波圖評估

視網膜電波圖是一種不同於利用行為來評估視力的方式，而是藉由整個視覺系統中每個部位的電位改變來進行評估。主要在於紀錄給予視網膜一個光源的刺激之後，電極鄰近的神經細胞以及非神經細胞興奮之後產生的膜電位改變的總合，並且利用電流計來紀錄測量電極以及參考電極形成的視網膜電波圖圖形，可以說是客觀且有效的評估視網膜功能的方法。一般來說，在視網膜電波圖中所呈現的 a 波為椎狀細胞以及桿狀細胞經過光刺激所產生的電位改變；b 波則是由穆勒氏細胞以及雙極細胞形成鉀離子的流動因而去極化所產生的電位改變；c 波則是來自於視網膜色素上皮層的電位改變 (Narfstrom K. *et al.*, 2002)，由於視網膜電波圖為來自對於所有感光細胞的反應總和，因此若是感光細胞在總個數上有減少，便會造成振幅的減小。

在之前的文獻提到，在光照形成視網膜功能傷害後，其視網膜電波圖的 a 波以及 b 波振幅與外層存活的感光細胞有高度的相關性，圖 2-1 可以觀察到在光照傷害之後，a 波以及 b 波的振幅有明顯的變小以及 b 波的斜率增大等現象，同時越強的光照也會造成越嚴重的振幅減小

(Sugawara *et al.*, 2000)；Noell 等人也發現在光照傷害之後的不同時間，會在視網膜電波圖上會呈現出不同程度的變化，如圖 2-2，因此可以作為評估光照形成視網膜病變程度的指標(Noell *et al.*, 1966)。另外也有研究進一步發現在降低的 b 波中，其中椎狀細胞其功能上的減退比起桿狀細胞所受到的影響來的更大(Takahashi & Machida *et al.*, 2005)。除此之外，若是波形的形狀改變，亦可能是因為視網膜退化造成的異常，像是一些早期的視網膜退化症可能因為傳導的異常導致 b 波的消失，因而形成負向的異常波型。

此外利用視網膜電波圖可以用來評估嘗試性藥物治療所能達到的神經保護效果，已經有許多文獻提出，在經過藥物治療之後對照於沒有投與藥物的組別，可以改善因為光照導致的 a 波以及 b 波振幅減小，則代表著此藥物具有神經保護的效果，可達到保留視力的效果。



#### *Scotopic ERG*

圖 2-1. 連續光照對於暗視野視網膜電波波形的影響。

除了控制組以外的視網膜電波圖皆在光照曝露後的第七天進行，可以見到在光照傷害之後，a 波以及 b 波的振幅會依傷害嚴重程度而有不一的減小。(Sugawara *et al.*, 2000)



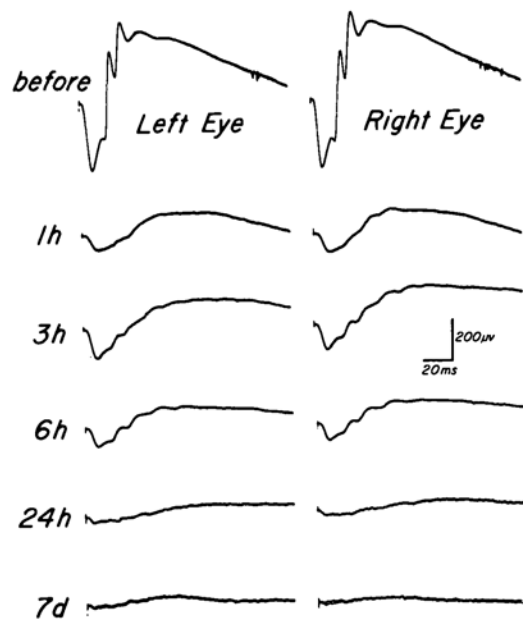


圖 2-2. 光照前以及光照傷害後不同時間點的視網膜電波圖變化。

可以見到在光照傷害後的不同時間點，其視網膜電波圖形會有不一的變化。另外在光照後 14 天的波形會和光照後第 7 天相似。(Noell *et al.*, 1966)

### C. 其他

由於光照的曝露會造成視網膜細胞的凋亡，因此藉由偵測細胞死亡狀態也可以用來評估光誘導的視網膜病變程度。在之前的文獻提到，在光照曝露之後的 12 小時即可利用電泳來偵測分裂的脫氧核糖核酸，同時若曝露時間越長，偵測到的分裂脫氧核糖核酸數量也會越多；除此之外，在光照曝露的六個小時後可以利用特殊染色方式也可以偵測到細胞凋亡時其染色體斷裂的斷裂口 (terminal transferase biotin-dUTP nick end labeling; TUNEL)，藉此評估細胞凋亡的狀況 (Abler & Chang *et al.*, 1996)，Zhang 等人發現最早在光照傷害之後三小時就可以在視網膜的外核層偵測到 TUNEL-positive 的反應，同時在光照一天之後達到最嚴重期，之後則在光照的 3-7 天之後逐漸的數量減

少，圖 2-3 可以看到在光照之後不同時間點視網膜細胞凋亡的狀況 (Gordon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005)。

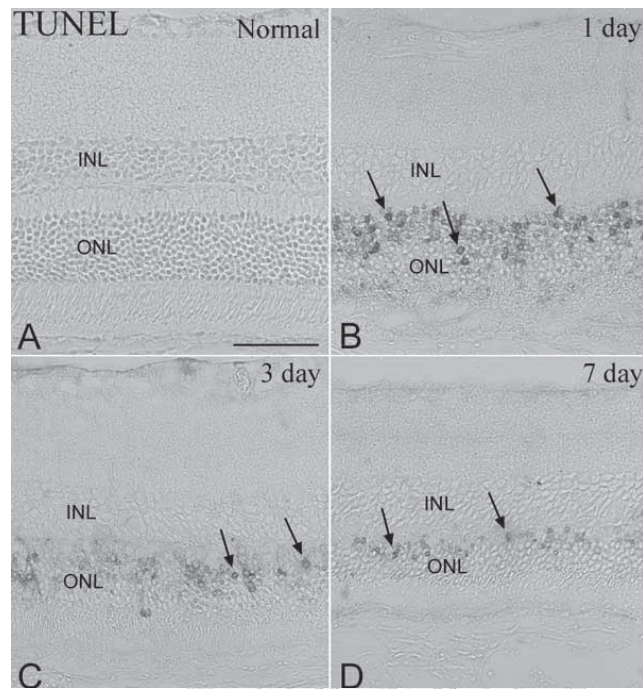


圖 2-3. 小鼠視網膜在光照傷害後不同時間點的 TUNEL 反應。  
A, 為正常沒有經過傷害的小鼠視網膜，可以見到沒有 TUNEL-positive 的反應。B, 箭頭所指為 TUNEL 陽性反應的細胞，光照後第一天的數量最多。C, 可見到光照後第三天的陽性細胞比第一天少。D, 光照後第七天陽性細胞已經很少見。INL : Inner nuclear layer, ONL : Outer nuclear layer。(Zhang *et al.*, 2005)

## 第2-4節 治療策略

近年來針對光誘導造成視網膜病變的傷害已有許多嘗試治療的方式被提出，包括幹細胞的移植、給予大量具有神經保護效果的細胞激素以及基因治療來將缺少的細胞植入或是移除有害的細胞等。治療的最主要方式仍是針對上述感光細胞凋亡的機制來介入並且達到神經保護的效果，例如在其他非眼睛的組織以及光誘導視網膜病變的動物模式下已經證實細胞內鈣離子的增加會導致細胞的死亡，因此藉由鈣離子通道阻斷劑可以達到保護的效果；或是給予抗氧化劑來減緩氧化傷害。表 2-2 介紹了過去部份文獻，已有不同的物質被研究證明在動物模式上可針對不同的機制來降低感光細胞的傷害(Wenzel *et al.*, 2005)。



| No                                  | Mechanism or target   | Treatment or therapy            | Species/Model of degeneration        | Effect of treatment                                 |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>Induction phase</i>              |                       |                                 |                                      |   |
| 1                                   | Visual cycle          | Halothane anesthesia            | M/Acute white light                  | Block of visual cycle; complete protection          |
| 2                                   | Visual cycle          | 13-cis retinoic acid            | M/White light (48 h)                 | Block of visual cycle, 80% rescue of ONL thickness  |
| <i>Death-signal transduction I</i>  |                       |                                 |                                      |   |
| 3                                   | Intracellular calcium | D-Diltiazem, Ca-channel blocker | M/Acute white light                  | Prevented occurrence of TUNEL-positive cells in ONL |
| 4                                   | Mitochondria          | BCL-2 Transgene                 | M /White light, (acute or 2-5 weeks) | No Effect   |
| 5                                   | Mitochondria          | BCL-2 Transgene                 | M/White light (2 weeks)              | Protection  |
| 6                                   | Mitochondria          | Bax/Bad double knockout         | M/White light (7h)                   | 90% protection                                      |
| 7                                   | Reactive oxygen       | DMTU                            | R/Prolonged green light up to 24h    | Protection  |
| 8                                   | Reactive oxygen       | DMTU                            | R/White light (24 h)                 | Protection  |
| 9                                   | Reactive oxygen       | PBN                             | R/White light (24 h)                 | Protection  |
| 10                                  | Reactive oxygen       | TRX                             | M/Acute white light                  | Protection  |
| 11                                  | NOS                   | L-NAME                          | M/Acute white light                  | Prevented occurrence of TUNEL-positive cells in ONL |
| 12                                  | NOS                   | L-NAME                          | M/White light (24 h)                 | Partial protection of morphology, not function      |
| 13                                  | NOS                   | L-NAME                          | R/Constant light (1 week)            | 35% Protection of morphology                        |
| <i>Death-Signal Transduction II</i> |                       |                                 |                                      |   |
| 14                                  | AP-1                  | Activation of GR, Steroids      | M/Acute white light                  | Block of AP-1 activity; complete protection         |
| 15                                  | AP-1                  | Lack of c-fos                   | M/Acute white light                  | Robust protection                                   |

| No                | Mechanism or target | Treatment or therapy                                     | Species/Model of degeneration | Effect of treatment   |
|-------------------|---------------------|--|-------------------------------|---|
| Unknown Mechanism |                     |  |                               |   |
| 16                | nd                  | LEDGF intravitreal injection                             | R/White light (48 h)          | Twice as many photoreceptors in treated eye                                 |
| 17                | nd                  | bFGF intravitreal injection                              | M/White light (2 weeks)       | Protection  |
| 18                | nd                  | bFGF intravitreal injection                              | R/White light (3-14d)         | 70% survival of photoreceptors vs. 28% in controls                          |
| 19                | nd                  | bFGF subretinal AAV                                      | R/White light (1 week)        | No Protection   |
| 20                | nd                  | bFGF intravitreal  | R/White light (1 week)        | Protection of morphology, but not function                                  |
| 21                | nd                  | HSV-1 Block of p75NTR                                    | R/White light (24 h)          | 26% increased survival of photoreceptors                                    |
| 22                | nd                  | Lack of p75NTR   | M/Acute white light           | Ca. 30% increased survival of photoreceptors                                |
| 23                | nd                  | Lack of p75NTR   | M/White light (2 to 3 weeks)  | No protection in p75 <sup>-/-</sup> , mild protection in p75 <sup>+/-</sup> |
| 24                | nd                  | EPO induced by hypoxia, i.p. injection or from transgene | M/Acute white light           | Robust protection   |
| 25                | nd                  | PEDF intravitreal injection                              | R/White light (3-14 d)        | 60% survival of photoreceptors vs. 28% in controls                          |
| 26                | nd                  | CNTF or Axokine intravitreal injection                   | M/White light for (1-2 weeks) | Protection  |
| 27                | nd                  | BDNF transgenic cell                                     | R/White light (1 week)        | Protection  |
| 28                | nd                  | BDNF intravitreal injection                              | M/White light (1-2 weeks)     | Protection  |
| 29                | nd                  | NT-4 intravitreal injection                              | M/White light (1-2 weeks)     | Protection  |
| 30                | nd                  | IGF-II intravitreal injection                            | M/White light (2 weeks)       | Protection  |
| 31                | nd                  | Luzindole, melatonin antagonist intravitreally           | R/White light (48 h)          | Protection  |

表 2-2 光誘導視網膜病變模式中嘗試的治療方式。M：mouse。R：rat。nd：not determined。(Wenzel *et al.*, 2005)

### 第三節 大麻二酚 (Cannabidiol) 的簡介與應用

#### 第3-1節 大麻生物鹼及其臨床應用潛力

大麻 (*cannabis sativa*) 為人醫用來治療精神方面疾病行之多年的一種藥物，包含了超過 460 種以上已知的化學物質，其中由大麻葉中提煉出約 80 種不同的物質，被統合命名為大麻生物鹼 (cannabinoid) 化合物。大麻生物鹼主要包括具有精神活性或成癮性的植物鹼 (psychoactive component)，例如：四氫大麻醇 ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; THC) 和大麻醇 (cannabinol; CBN) 等；以及不具有成癮性的物質 (non-psychoactive component)，例如：大麻二酚 (cannabidiol; CBD) (Amar *et al.*, 2006)。這些大麻生物鹼除了已知會造成精神方面影響的效果以外，表 3-1 列出研究發現在其他方面的藥理作用，包括止吐、刺激食慾、止痛、抗癲癇、抗癌、抗發炎、免疫調節等效果，近年來更發現具有神經保護的效果(Sinor *et al.*, 2000)。

除此之外，經由研究發現在實驗動物模式下同時給予四氫大麻醇以及大麻二酚兩個藥物之後，大麻二酚可以拮抗部份四氫大麻醇的副作用，但同時還能保有四氫大麻醇的治療效果。也因此大麻二酚的作用以及機制更需要進一步的研究探討(Karniol & Carlini *et al.*, 1973; Russo & Guy *et al.*, 2006)。

| Effect   | THC | CBD |
|--|-----|-----|
| <b>Receptor/Non-Receptor Effects</b>                       |     |     |
| CB <sub>1</sub> (CNS/PNS receptors)                        | ++  | ±   |
| CB <sub>2</sub> (peripheral receptors)                     | +   | ±   |
| Vanilloid (TRPV <sub>1</sub> ) receptors                   | -   | -   |
| Anti-inflammatory  | +   | +   |
| COX-1, COX-2 inhibition                                    | -   | -   |
| Immunomodulatory   | +   | +   |
| <b>CNS Effects</b>   |     |     |
| Anticonvulsant   | +   | ++  |
| Muscle relaxant  | ++  | +   |
| Antinociceptive  | ++  | +   |
| Psychotropic   | ++  | -   |
| Anxiolytic   | ±   | ++  |
| Antipsychotic  | -   | ++  |
| Neuroprotective antioxidant                                | +   | ++  |
| Antiemetic   | ++  | +   |
| Sedation   | +   | -   |
| Agitation (Alzheimer disease)                              | +   | -   |
| Tic reduction (Tourette syndrome)                          | +   | ?   |
| Opiate withdrawal reduction                                | +   | ?   |
| Migraine treatment   | +   | +   |
| Bipolar disease  | +   | ?   |
| Dystonia   |     | +   |
| Parkinsonian symptoms                                      | +   | ?   |
| Withdrawal symptoms to other drugs (reduction)             | +   | +   |
| Motor neurone disease (ALS) (increased survival, function) | +   | +   |
| <b>Cardiovascular Effects</b>                              |     |     |
| Bradycardia  | -   | +   |
| Tachycardia  | +   | -   |
| Hypertension   | +   | -   |
| Hypotension  | -   | +   |
| <b>Appetite/Gastrointestinal</b>                           |     |     |
| Appetite   | +   | -   |
| GI motility (slowed)                                       | ++  | +   |
| <b>Anti-Carcinogenesis</b>                                 |     |     |
| Glioma (apoptosis)   | +   | +   |
| Glioma cell migration                                      |     | +   |
| <b>Ophthalmological</b>                                    |     |     |
| Intra-ocular pressure (reduced)                            | ++  | +   |
| Night vision   | +   | -   |

表 3-1 四氫大麻醇 (tetrahydrocannabinol, THC) 與大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 的作用。(Russo & Guy *et al.*, 2006)

### 第3-2節 大麻二酚的作用機制簡介

大麻二酚 (cannabidiol; CBD) 在 1930-1940 年之間首次由大麻葉中被分離出，一直到了 1963 年才有比較詳盡的研究，同時約莫 1970 年才有相關的藥理作用以及化學性質的研究報告，其與四氫大麻醇的化學結構差異如圖 3-1。一般來說這些大麻生物鹼物質 (cannabinoid compounds) 是藉由作用在大麻受體 (cannabinoid receptor) 來達到生物學上的效果，這些受體主要分為 CB1 receptor、CB2 receptor、以及 abnormal-cannabidiol-sensitive receptor 三種。CB1 是腦中數量相當多的 G 蛋白耦合受體 (G protein-coupled receptor)，在大腦皮質、基底核、海馬迴、杏仁核、小腦等區域所含的密度最高。

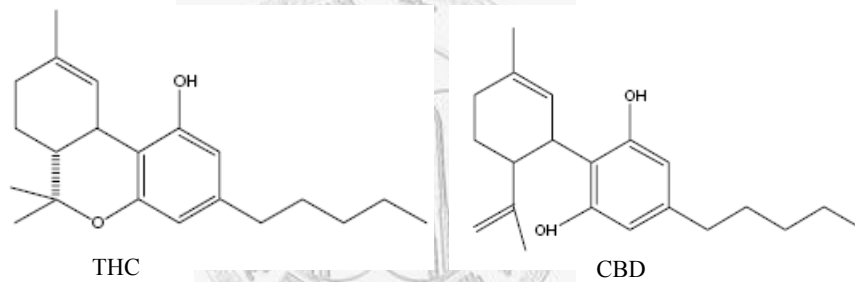


圖 3-1 四氫大麻醇 (tetrahydrocannabinol, THC) 與大麻二酚 (cannabidiol, CBD) 化學結構表示。(Russo & Guy *et al.*, 2006)

在之前的研究顯示，四氫大麻醇主要藉由作用在大麻受體 (CB1 receptor) 而具有保護大腦缺血性傷害的效果(Hayakawa *et al.*, 2004)。除此之外 CB2 主要表現於周邊組織，是主掌免疫相關功能的受體。然而研究中發現大麻二酚與 CB1 以及 CB2 兩種大麻酚受體的接合力 (affinity) 非常的低，但卻發現大麻二酚在實驗動物以及人體皆具有抗癲癇的效果，因此認為大麻二酚主要藉由接合在 CB1 與 CB2 以外的受體來達到效果，但此受體目前尚未被確認以及複製出，暫稱為 abnormal-cannabidiol-sensitive



receptor(Walter *et al.*, 2003)。此外研究中也發現大麻二酚還具有抗焦慮、安眠以及免疫系統方面的效果，近年來更有包括抗氧化功能、抗局部缺血性傷害以及治療風濕性關節炎的效果被發表(Mechoulam *et al.*, 2002)，不過到了目前為止大麻二酚引起這些效果的機制仍然不清楚，有研究顯示大麻二酚具有抑制 anandamide amidase 的效果使得極樂醯胺 (anandamide) 可以被重吸收，因此認為大麻二酚具有神經保護的抗氧化效果(Watanabe *et al.*, 1996)，但是到目前尚未有定論。

在之前的文獻將目前可能的大麻二酚作用機制歸類為幾個可能 (Mechoulam & Peters *et al.*, 2007)：

- (1) 大麻二酚被發現在小鼠的腦中具有拮抗 CB1 以及 CB2 受體致效劑的效果，除此之外大麻二酚在人體被發現具有反轉 CB2 受體的效果，也因此有人認為因為這個效果使得大麻二酚具有抗發炎的作用。除此之外，近年來有研究發現大麻二酚為鴉片類受體 (opioid receptor) 的異位調控劑 (allosteric modulator)，因而具有影響  $\mu$ 、 $\delta$  等鴉片類受體的效果。
- (2) 增加腺核苷 (adenosine) 的訊息傳導：腺核苷 (adenosine) 是一種嘌呤類 (purine) 的核苷酸 (nucleoside)，在一些不利的狀況下，例如炎症反應時，受傷的神經元細胞就會產生腺核苷，經由腺核苷受器對所有免疫細胞產生抑制的效果，進而減少炎症前驅物質的產生，達到保護的效果。在之前研究顯示以大麻二酚治療之後會減少微膠細胞中  $^3\text{H}$ -thymidine 的重吸收，因而具有促進內源性腺核苷的訊息傳導，同時減少炎症前驅物質例如 TNF- $\alpha$  的產生，因此具有免疫抑制以及抗發炎的效果(Liou *et al.*, 2008)。
- (3) 研究顯示大麻二酚在人體會適度的與血清素受體 5-HT<sub>1a</sub> 接合，因此可以抑制 WAY100135，這是一個 5-HT<sub>1a</sub> 受體拮抗劑，當大腦有梗塞

時給予大麻二酚可以增加大腦的血流，因而達到神經保護的效果。

- (4) 由於大麻二酚是由大麻葉中萃取出來的物質，具有酚環 (phenol) 的結構，尤其是其中間苯二酚 (resorcinols) 的構造，在先前的研究中已證實具有抗氧化以及神經保護的效果，研究也證實大麻二酚具有預防過氧化氫造成的氧化性傷害，其抗氧化的效果甚至比維他命 C 或是維他命 E 效果來的更好，因此認為大麻二酚在一些氧化性神經疾病應該具有治療的療效。

因此根據大麻二酚許多不同的機制而可能成為神經保護的藥物：

- (1) 抗發炎反應 (antiinflammatory effect) 以及抗氧化緊迫：

Malfait 等人以活體外 (*in vitro*) 實驗發現以大麻二酚進行治療有關節炎的小鼠淋巴細胞可以降低 IFN- $\gamma$  以及 TNF- $\alpha$  的釋放，而 TNF- $\alpha$  是關節炎過程中重要的炎症反應前驅細胞激素

(pro-inflammatory cytokine)，且與劑量成正相關的效果。此外也具有抑制活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS) 的釋放以及減少 NO 產生的效果(Malfait *et al.*, 2000)。

Sacerdote 等人也以活體與活體外的實驗證實給予大麻二酚具有減少炎症反應前驅細胞激素 IL-12 並且增加抗發炎反應細胞激素 IL-10 的分泌(Sacerdote *et al.*, 2005)。

除此之外，El-Remessy 等人提出分別在患有糖尿病或是內毒素誘使之葡萄膜炎的實驗鼠模式下，給予大麻二酚的治療並評估其對於視網膜的保護效果，研究中發現大麻二酚減少視網膜神經毒性、血腦障蔽 (blood-brain barrier) 的崩壞以及發炎的反應，大麻二酚可以有效減少氧化傷害、同時降低 TNF- $\alpha$ 、血管新生因子 (VEGF)，並且抑制 p38-MAP kinase，由於 p38 MAPK 為一種炎症反應的訊息傳遞物質，不但與微膠細胞的活化具有重要的相關性，同時細胞的

存活也參予了重要的角色。(El-Remessy *et al.*, 2006; El-Remessy *et al.*, 2008)。

(2) 抗細胞凋亡作用 (antiapoptosis effects) :

Iuvone 等人在活體外實驗下發現，大麻二酚可以抑制誘發神經退化的  $\beta$ -amyloid peptide。之前的研究已證實暴露在  $\beta$ -amyloid peptide 的細胞會造成活性氧分子的增加以及脂質的超氧化，同時 caspase-3 活化，造成一連串細胞凋亡的訊息傳遞進而使核苷酸分解，同時增加細胞內的鈣離子濃度，進一步導致細胞的凋亡死亡。而大麻二酚的治療可以減緩上述的過程，另外也可以減緩 caspase-3 的前驅物 (pro-caspase-3) 的產生，同時也具有抑制 p38-MAP kinase 磷酸化的過程，因此具有神經保護的效果。

#### 第四節 Minocycline 的簡介與臨床應用

##### 第4-1節 Minocycline 的簡介及臨床潛力

Minocycline hydrochloride 是一種半合成，高度親脂性的四環黴素 (tetracycline) 的衍生物，其化學式如圖 4-1。近十年來除了被應用作為治療許多革蘭氏陽性以及陰性菌的感染，到目前為止也被廣泛的使用作為抗發炎、抗壞死 (antiapoptosis) 以及抗膠原酶 (anticollagenase)、免疫抑制以及免疫調節的功能，也因此近年來也被當作類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) 的治療藥物(Baptiste *et al.*, 2004; Elewa *et al.*, 2006)。除此之外在過去五年不斷的有研究指出在許多種急性神經創傷的動物模式下，發現 minocycline 具有良好的神經保護的效果，如表 4-1 所示(Zemke & Majid *et al.*, 2004)。

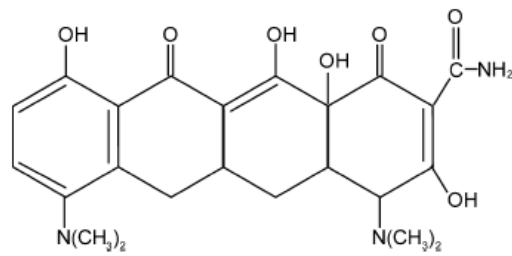


圖 4-1 Minocycle hydrochloride 的化學結構式。

(Zemke & Majid *et al.*, 2004)

| Animal Model of Disease       | Effect of Minocycline   |
|-------------------------------|---|
| Focal ischemia                | Decreased caspase 1 expression, inhibition of microglial activation   |
| Global ischemia               | Decreased caspase 1 expression, decreased iNOS expression, inhibition of microglial activation  |
| Neonatal hypoxic ischemia     | Inhibition of calpain-cleaved substrate production, inhibition of caspase 3   |
| Intracerebral hemorrhage      | Decreased MMP-12 expression, inhibition of microglial activation, inhibition of apoptosis   |
| Traumatic brain injury        | Inhibition of caspase 1   |
| Spinal cord injury            | Inhibition of caspase 3, inhibition of cytochrome c release   |
| Huntington disease            | Decreased caspase 1 expression, decreased caspase 3 expression, inhibition of iNOS  |
| Amyotrophic lateral sclerosis | Inhibition of cytochrome c release  |
| Multiple sclerosis            | Decreased MMP-2 expression, increased IL-10 synthesis, decreased TNF- $\alpha$ synthesis  |
| Parkinson disease             | Decreased caspase 1 expression, decreased iNOS expression, inhibition of microglial activation, inhibition of p38 MAPK phosphorylation, inhibition of NADPH oxidase |

表 4-1 Minocycline 在神經疾病的實驗動物模式下具有的神經保護效果。(Zemke & Majid *et al.*, 2004)

#### 第4-2節 Minocycline 的神經保護機制簡介

雖然到目前為止，minocycline 確實的作用點仍不完全清楚，但在許多的神經保護相關研究提出不少目前發現 minocycline 進行作用的機制。其中包括 minocycline 具有高度親脂性的特性，因此可以在腦部受創時穿過血腦障蔽而達到抗麩胺酸興奮毒性 (glutamate excitotoxicity)、抑制微膠細胞 (microglial cell) 的活化以及抑制細胞凋亡前趨物質 (proapoptosis mediator) 的功能，因此增加神經細胞的存活 (Tikka *et al.*, 2001)。除此之外在其他的研究也指出，minocycline 也具有抑制粒腺體釋放 cytochrome c 以及抑制 caspase-dependent 和 caspase-independent 的神經細胞死亡途

徑，因此達到神經保護的效果(Baptiste *et al.*, 2004)。

而在眼睛相關方面，Zhang 等人於之前文獻提出以光照曝露造成視網膜傷害的模式下，眼睛內的微膠細胞會朝視網膜的外層移動，並且進一步惡化視網膜細胞的退化。由於微膠細胞已被證實與許多神經傷害相關(McGeer & McGeer *et al.*, 1995)，因此在 2004 年 Zhang 等人以光誘導視網膜病變的大鼠模式，並給予 minocycline 做嘗試性的治療來探討其神經保護效果以及其機制，在實驗結果證實經由全身給予 minocycline 之後具有減少微膠細胞的活化並且達到神經保護的效果(Zhang & Lei *et al.*, 2004)。

Leung 等人也發現在活體外 (*in vitro*) 模式下以光誘導牛的感光細胞傷害，給予 9  $\mu\text{M}$  濃度的 minocycline 可以有效的達到保護感光細胞的效果，由於此篇研究中並沒有偵測微膠細胞的數量，因此作者認為除了間接抑制微膠細胞活化的效果以外，最主要是因為 minocycline 具有直接抗發炎以及抗氧化效果，此外還可以抑制 caspase 的活化達到抗細胞凋亡的效果(Leung *et al.*, 2007)。

統整目前研究的結果，認為 minocycline 主要是因為下列幾項機制而達到神經保護的效果(Zemke & Majid *et al.*, 2004)：

一、抗發炎效果：

(1) 抑制免疫細胞的活化以及 matrix metalloproteinases (MMPs) 的釋放：

研究證實許多疾病在發炎的過程時，MMPs 與組織傷害具有相當重要的關連性。這是因為 MMPs 會破壞細胞外基質的許多物質，因此使得發炎細胞包括嗜中性球以及 T 型淋巴球等的移入，因而導致組織傷害。近年來有研究證明 minocycline 以及其他四環黴素皆具有抑制 MMPs 的效果，並在自體免疫造成的腦膜炎實驗模式下，發現給予 minocycline 具有抑制 MMPs 並減緩 T 淋巴球的遷移的現象

(Brundula *et al.*, 2002; Stirling *et al.*, 2005)。

(2) 調節微膠細胞的活化：在之前的研究中證實微膠細胞的活化與細胞發炎以及壞死具有重要的關聯性，Yrjänheikki 等人則發現在大腦或是局部缺血壞死時，給予 minocycline 具有減少微膠細胞活化的效果 (Yrjänheikki *et al.*, 1998)。

(3) 抑制一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) 的活性，同時具有抑制發炎性細胞激素的釋放。

二、抗細胞凋亡的效果：在研究中發現，給予 minocycline 可以減少 calpain-cleaved substrate 的產生，此物質是細胞壞死 (necrosis) 時重要的標的；此外 minocycline 具有抑制 lactate dehydrogenase、caspase-dependent 以及 caspase-independent 等細胞凋亡 (apoptosis) 的重要途徑，因此具有減緩細胞壞死以及凋亡的效果，預防細胞的死亡。

雖然 minocycline 在臨床上實際使用的案例還不是非常的廣泛，應用於眼睛方面作為神經保護的試驗仍在起步，但由於其具備良好的脂溶性以及安全性，加上在許多研究中皆可達到良好的神經保護效果，應用於臨床作為神經保護藥物的潛力無窮。

### 第三章 實驗材料與方法

#### 第一節 實驗動物

本實驗使用雄性 5 週齡之 Spraque-Dawley (SD) 大鼠，屬於對光照形成視網膜傷害具有感受性的白化鼠品系。體重約在 150 到 200 公克之間，係由國立陽明大學動物實驗中心購得。所有實驗動物皆飼養在動物籠舍中，採任食與充足的水分，維持適宜恆定的溫度以及濕度，並且固定為 12 小時燈光以及 12 小時暗室循環替換光照週期。本動物實驗的進行皆符合 ARVO

(Association for Research in Vision and Ophthalmology) 眼科動物研究使用規定 (ARVO statement for the Use if Animal in Ophthalmic and Vision Research)。

犧牲動物選擇以過量的全身麻醉藥 thiamylal sodium (Citosol<sup>®</sup>) 腹腔注射方式進行安樂死。

#### 第二節 光誘導視網膜病變之大鼠模式

所有實驗大鼠在進行光誘導傷害前皆統一飼養於設定為 12:12 光照週期的飼養動物舍，動物舍的燈光強度為 50-100 lux 之間。本實驗依據 Noell 的研究採用相同的光照模式，將大鼠分開單獨飼養於透明或是透光的鼠籠內，燈光選擇白熾光 (white cool light) 置於鼠籠的正上方，將環境密閉使光照度介於 1200-1400 lux 條件之下，以 12:12 的光照循環週期進行兩個全天。實驗結束之後再移回統一飼養籠舍。

#### 第三節 實驗材料與分組

本研究中選擇給予的藥物包括大麻二酚 (cannabidiol; CBD)，購於 THC PHARM GmbH 與米諾信 (Mirosin<sup>®</sup> injection, minocycline HCL 100 mg/vial, 汎生)，後者為臨床上使用的注射型藥物。

實驗分組包括：

1. 對照組 (vehicle)：給予以 10% Tween 20 加上 10% 無菌酒精混合於生理食鹽水的溶液做為光誘導視網膜病變的治療對照組。
2. cannabidiol 治療組：為了解有效劑量，並比較單次與多次給予哪一種方式對於傷害可達到較佳的保護效果，因此又區分為
  - (1) 每日給予 5 mg/ kg，單一給予 (C5-1)。
  - (2) 每日給予 10 mg/ kg，單一給予 (C10-1)。
  - (3) 每日給予 20 mg/ kg，單一給予 (C20-1)。
  - (4) 每日給予 5 mg/ kg，連續給予 4 天 (C5-4)。
  - (5) 每日給予 10 mg/ kg，連續給予 4 天 (C10-4)。
3. minocycline 治療組：
  - (1) 每日給予 45 mg/ kg，單一給予 (mino-45)。
  - (2) 每日給予 90 mg/ kg，單一給予 (mino-90)。

#### 第四節 藥物的劑量與投予

大麻二酚 (cannabidiol) 於每次投予前將大麻二酚晶體以 100% 無菌酒精溶解，並且根據實驗分組需要來配置成濃度為 2.5 mg/mL (5 mg/ kg)、5 mg/mL (10 mg/ kg) 或是 10 mg/mL (20 mg/ kg)，在注射入動物體之前再以 10% Tween 20 來作十倍濃度稀釋。大麻二酚對照組則是給予 10% Tween 20 加上 10% 無菌酒精混合於生理食鹽水的溶液來做對照。所有大鼠皆在接受光誘導視網膜傷害前 12 小時投藥，之後根據分組不同選擇單次給予或是連續多天給予 (每次給藥間隔 24 小時)。所有投藥方式採腹腔注射。

Minocycline 則是將 Minocin<sup>®</sup> injection 以生理食鹽水泡製為 2 mL 的溶液，使其濃度為 50 mg/mL。Minocycline 治療實驗組為 45 mg/ kg/ day 以及 90 mg/ kg/ day 兩組，單次投予。所有大鼠皆在接受光誘導視網膜傷害前 12 小時投藥。投藥方式皆為腹腔注射。



## 第五節 視網膜電波圖之紀錄與分析

在光照曝露前記錄正常大鼠的視網膜電波圖圖形，同時在光誘導視網膜病變之後的第七天進行視網膜電波測量。使用的機器以及軟體為 BPM-100 Control Program System，ERG/VEP v5.50，RetinoGraphic Inc，USA。此儀器使用的是隱形眼鏡式，以金箔進行傳導的單導紀錄電極（contact lens electrode，ERG-jet，Universo Plastique Inc，Le Cret-du-Loche，Switzerland），參考電極則是細針式電極（platinum subdermal needle electrode F-E2，Grass-Telefactor Division，Astro-Med, Inc，West Warwick，RI，USA），而接地電極則是使用電夾式電極（ground electrode，Grass-Telefactor Division，Astro-Med, Inc，West Warwick，RI，USA）。所有進行視網膜電波圖檢查的大鼠會在前一天移入暗室環境，進行至少 12 小時的黑暗適應期（dark adaptation）。

檢查進行時將大鼠以 isoflurane 進行全程全身麻醉，並以保溫水毯維持體溫。檢查前先給予局部麻睫散瞳（Mydriacyl，tropicamide<sup>®</sup> 0.5%，Alcon）進行散瞳，檢查時將接地電極夾住該檢查側的耳翼部，參考電極則置於該檢查側外眼角至耳翼的皮下空間，同時紀錄電極則是先以傳導膠佈滿，再置於該檢查側的眼角膜上。

檢查方式使用的為閃光式視網膜電波圖模式（flash electroretinogram），其閃光光源設定為 0 dB（亮度單位：10dB 相當於  $1 \log \text{cd-s/m}^2$ ，亦相當於 1 log-unit），每次結果會取兩次的閃光光照進行平均，每兩次光照之間則是間隔 10 秒的時間。

所有大鼠的視網膜電波圖皆會使用該軟體進行評估，其中 a 波振幅數值為基準線至 30 毫秒內第一個最明顯的負向波谷，b 波則是由先前負向波形最低點至下一個最大的波峰頂點。

## 第六節 組織病理學切片評估

所有大鼠在進行光誘導視網膜病變之後的第七天，利用過量的 thiamylal sodium (Citosol<sup>®</sup>) 麻醉藥以腹腔注射進行犧牲，之後將所有大鼠的兩隻眼睛以經結膜式進行全眼球摘除 (transconjunctival enucleation)。取下的眼球組織放入 10% formaldehyde 進行固定。之後再從視神經處將眼睛分為眼半球 (eye-cup)，並且製作組織切片同時以 hematoxylin-eosin (H&E) 來做染色。

所有的組織切片皆以光學顯微鏡 (Nikon elipse 200) 觀察是否有病理上的變化，包括細胞的型態以及整體的結構是否有異常。

測量統計的部份，利用軟體計算所有組織切片的視網膜各層厚度，測量點為從視網膜切片中的視神經頭前後 250  $\mu\text{m}$  處開始，以每 500  $\mu\text{m}$  間隔向前後延伸並選取兩處作測量，每個眼球一共選取六處視網膜的區塊進行測量，進行統計的內容包括內叢狀層 (inner plexiform layer; IPL)、內核層 (inner nuclear layer; INL)、外叢狀層 (outer plexiform layer; OPL)、外核層 (outer nuclear layer; ONL)、以及感光細胞層 (photoreceptor segment layer; PSL) 各層的厚度，每次的測量皆由同一人員進行操作。

## 第七節 微膠細胞免疫組織化學染色評估

為了確認在光照傷害之後，在視網膜是否有微膠細胞的活化，以及觀察藥物對於微膠細胞的影響，使用免疫組織化學染色方式來確認微膠細胞的變化。分別在光照傷害之後的第一天、第二天、以及第三天利用過量的 thiamylal sodium (Citosol<sup>®</sup>) 麻醉藥，以腹腔注射來進行安樂死，安樂死的大鼠進行經結膜式進行全眼球摘除 (transconjunctival enucleation)，並依照下列方式進行染色：

- (1) 將眼球組織放入 optimal cutting temperature (OCT compound) 進行包埋並

置放於-80°C冰箱進行冷凍保護，之後進行冷凍切片（cryosection）。

- (2) 以 100% 丙酮（acetone）進行固定 6 分鐘，並風乾至少 30 分鐘。
- (3) 以 PBS 沖洗 3 次之後加入 3% 過氧化氫（hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 【Merck, Darmstadt, Germany】）在 37°C 環境下，避光靜置 15 分鐘，再以 3 次 PBS 沖洗。
- (4) 以 2.5% 正常馬血清（horse normal serum）覆蓋，於 37°C 環境下避光靜置 30 分鐘。
- (5) 以 primary antibody（mouse anti-OX42, 1:100 [Chemicon, Millipore]）覆蓋，於 37°C 環境下避光靜置 45 分鐘。PBS 沖洗 3 次，每次 3 分鐘。
- (6) 以 Non-Biotin Polymer HRP 染色偵測套組（super sensitive TM non-biotin HRP detection system; BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA）進行染色：
  - 以 super enhancer reagent 覆蓋，於 37°C 環境下避光靜置 60 分鐘。PBS 沖洗 3 次，每次 3 分鐘。
  - 以 poly-HRP reagent 覆蓋，於 37°C 環境下避光靜置 60 分鐘。PBS 沖洗 3 次，每次 3 分鐘。
  - 以 one step AEC（3-amino-9-ethylcarbazole）覆蓋 1 分鐘進行呈色。PBS 沖洗 3 次，每次 3 分鐘。
- (7) 以蘇木紫（hematoxylin stain solution [Muto pure chemicals, Tokyo, Japan]）覆蓋 1~2 分鐘進行背景色染色。
- (8) 沖洗後烘乾，並以水溶性膠進行封片。

## 第八節 統計與分析方法

對於不同給藥的組別中，分析視網膜電波圖 a 波以及 b 波出現的時間以及振幅大小，同時評估組織切片下視網膜厚度的變化，並將各組資料與對照

組以 Student's *t*-test 做分析，比較彼此之間是否有顯著差異。而各組藥物之間會針對不同劑量以及不同投藥次數分別進行單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 以及雙因子變異數分析 (two-way ANOVA) 來了解劑量與投藥次數之間的關係以及是否具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

另外在不同時間點計算微膠細胞的個數，並將各組資料與對照組之間以 Student's *t*-test 比較是否有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



## 第四章 實驗結果

### 第一節 視網膜電波圖之分析結果

在本研究的前導試驗中發現，以低強度、長時間的光照誘導視網膜傷害程度，可以以視網膜電波圖的振幅大小來進行程度上的評估，並依照視網膜電波圖中波形的振幅大小來調整適合的光照傷害。在前導試驗的結果顯示，以 1500~1800 lux 強度的光照進行 24 小時（12：12 循環的光照週期）的曝露，會造成視網膜嚴重且不可回復性的傷害。因此在本研究中採取 1200~1400 lux 的強度進行光照傷害。

除此之外，前導試驗發現，光照傷害之後的第七天與光照傷害後第十四天所進行的視網膜電波圖，無論是在波形振幅大小以及時間並無明顯的差異，因此本實驗一律在光照傷害後第七天進行視網膜功能性的評估。

圖 4-1 紀錄視網膜電波圖的結果，分別代表光照傷害前的正常對照組（N）、治療對照組（V）、大麻二酚治療組（包括 5 mg/kg、10 mg/kg 兩種劑量下單次給予與多次給予的紀錄、20 mg/kg 劑量的單次給予）、minocycline 治療組（包括 45 mg/kg、90 mg/kg 兩種劑量的單次給予）。可看出光曝露造成的振幅下降，以及各組治療組與正常對照組的波形差異。

#### 第 1-1 節 視網膜電波圖 a 波之分析結果

表 4-1 以各治療組在光照之後第七天視網膜電波圖中 a 波的振幅，相對於光照傷害前正常視網膜電波圖 a 波振幅做百分比比較（光照傷害後的數值除以光照傷害前的數值），可以發現因為視網膜電波圖的測量為敏銳的測量工具，加上不同大鼠彼此之間的個體差異造成每次測量上的變化。此外在表 4-1 可以見到光照傷害後對於各組的 a 波振幅都有一定程度的減少，其中又以治療對照組下降的最多，僅剩正常的  $8.5 \pm 2.9\%$ （平均值  $\pm$  標準差；n=4）。

利用圖 4-2 可以比較經過各組藥物治療後，比起治療對照組可以保留的 a 波振幅。其中除了以 cannabidiol 5 mg/ kg/ day，連續給四天這組沒有顯著差異以外，其他各組皆達顯著差異 ( $p<0.05$ )，代表對視網膜 a 波振幅具有保護的效果。

針對給予 cannabidiol 濃度中對於 a 波保護效果較佳的 5 mg/ kg/ day 與 10 mg/ kg/ day 這兩組，進一步評估劑量與給予次數對於 a 波振幅保護效果的影響，在圖 4-3 可見到利用雙因子變異數分析所得到的結果，可以發現對於視網膜 a 波振幅的保留主要和給予次數相關，單次給予的效果明顯比多次給予的效果佳 ( $p<0.05$ )。而給予的兩個濃度之間則無顯著的差異。

在觀察視網膜 a 波出現時間方面，在圖 4-4 可以發現除了以 minocycline 90 mg/ kg/ day 單次給予這組以外，其他各組與治療對照組皆明顯的下降 ( $p<0.05$ )，同時與治療對照組相比並無明顯的差異。代表光照傷害會造成視網膜電波圖的 a 波出現時間提早，只有以 minocycline 90 mg/ kg/ day 單次給予可達到保護的效果。

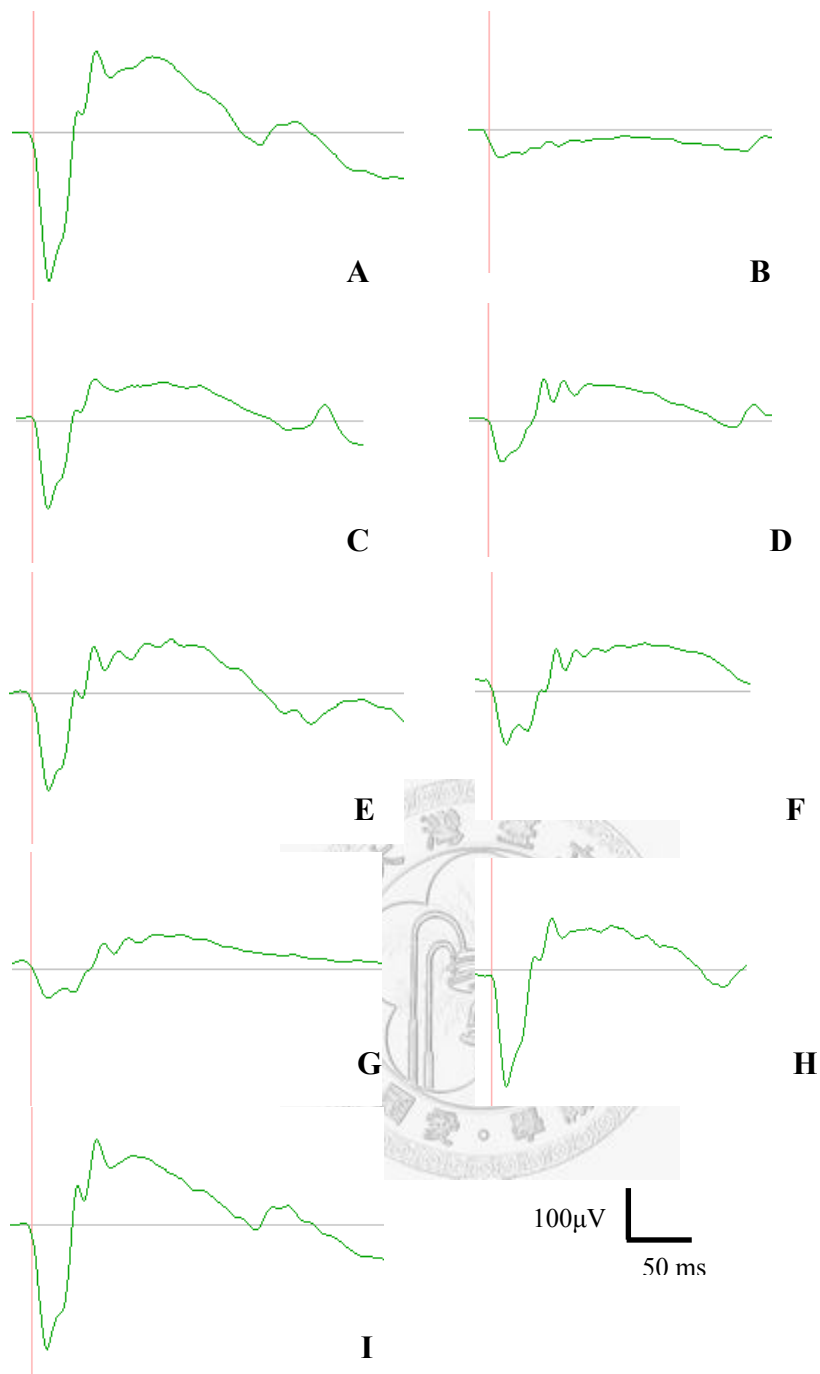


圖 4-1. 正常大鼠以及光照傷害後第七天各治療組之視網膜電波圖表現。

以閃光式視網膜電波圖記錄儀器 BPM-100，光源強度為 0 dB，閃光間隔 10 秒，取兩次波型計錄的平均，設定為平滑程度 3。所有大鼠進行檢測前皆暗視野適應 12 小時。A：正常大鼠；B：治療對照組；C：cannabidiol 5 mg/ kg/ day，單次給予；D：cannabidiol 5 mg/ kg/ day，給予四次；E：cannabidiol 10 mg/ kg/ day，單次給予；F：cannabidiol 10 mg/ kg/ day，給予四次；G：cannabidiol 20 mg/ kg/ day，單次給予；H：minocycline 45 mg/ kg/ day；I：minocycline 90 mg/ kg/ day。

表 4-1. 光照誘導視網膜病變前與光照傷害後第七天各組視網膜電波圖 a 波振幅百分比

| Rat No.<br>Group | No. 1  | No. 2  | No. 3  | No. 4  | No. 5 | Mean±SD    |
|------------------|--------|--------|--------|--------|-------|------------|
| N                | 85.2%  | 110.1% | 87.4%  | 109.4% | 97.7% |            |
| V                | 15.3%  | 1.2%   | 9.1%   | 8.9%   |       | 8.5±2.9%   |
| C5-1             | 32.8%  | 35.7%  | 42.9%  | 70.9%  |       | 45.6±8.7%  |
| C5-4             | 15.4%  | 26.7%  | 20.6%  | 5.2%   |       | 17.0±4.6%  |
| C10-1            | 41.7%  | 41.6%  | 39.6%  | 41.0%  |       | 33.4±7.6%  |
| C10-4            | 26.2%  | 15.2%  | 32.2%  |        |       | 24.5±5.0%  |
| C20-1            | 18.5%  | 43.3%  | 38.4%  | 38.4%  |       | 34.6±5.5%  |
| Mino-45          | 104.2% | 96.0%  | 75.9%  | 84.2%  |       | 90.1±6.2%  |
| Mino-90          | 80.2%  | 110.6% | 104.1% | 105.7% |       | 100.1±6.8% |

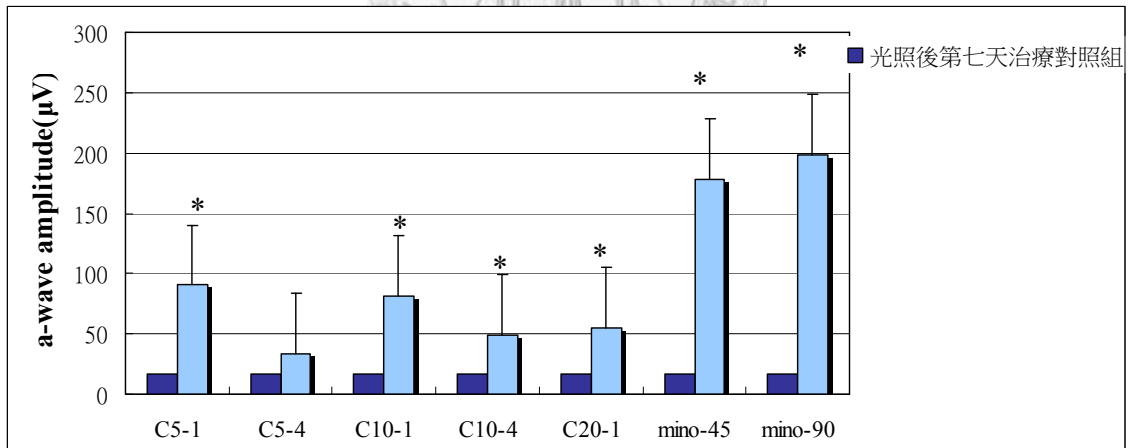


圖 4-2. 光照誘導視網膜病變後第七天各治療組與治療對照組之視網膜電波圖 a 波振幅示意圖。

除了以 cannabidiol 5 mg/ kg 連續給予 4 天這組之外，其餘各組皆具顯著差異。代表光照曝露對於視網膜電波圖波型中的 a 波會造成影響，但在以 cannabidiol 5 mg/ kg 連續給予 4 天這組以外的治療組皆具有保護效力。資料以各組 mean± SEM 表示。\*：光照傷害後第七天波幅差異 p< 0.05。



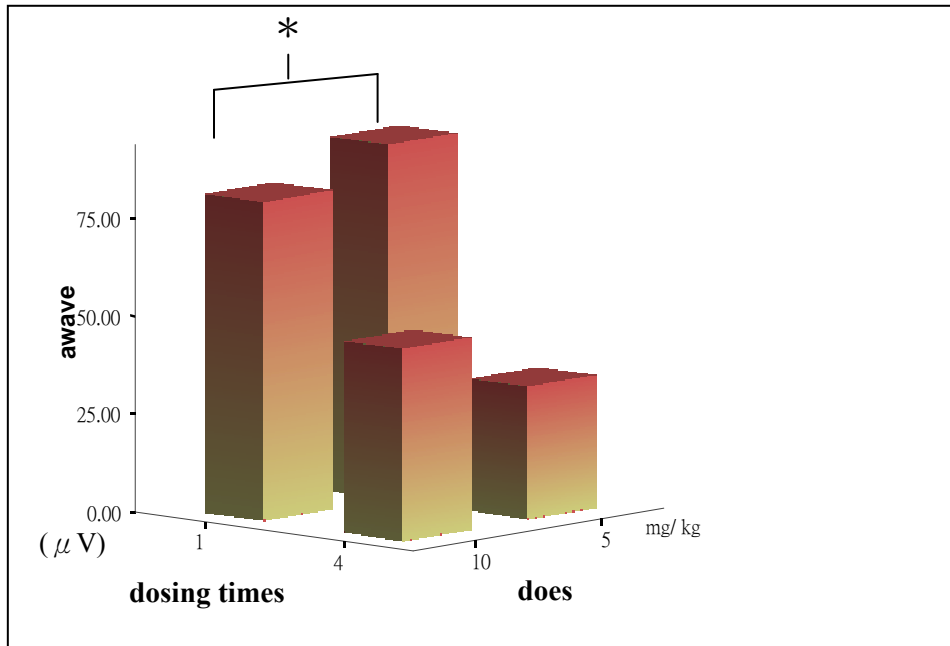


圖 4-3. 光照誘導傷害後第七天，給予 cannabidiol 不同次數與劑量下視網膜電波圖 a 波的示意圖。dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量。資料以平均值表示。\*：光照傷害後第七天波幅差異  $p < 0.05$ 。

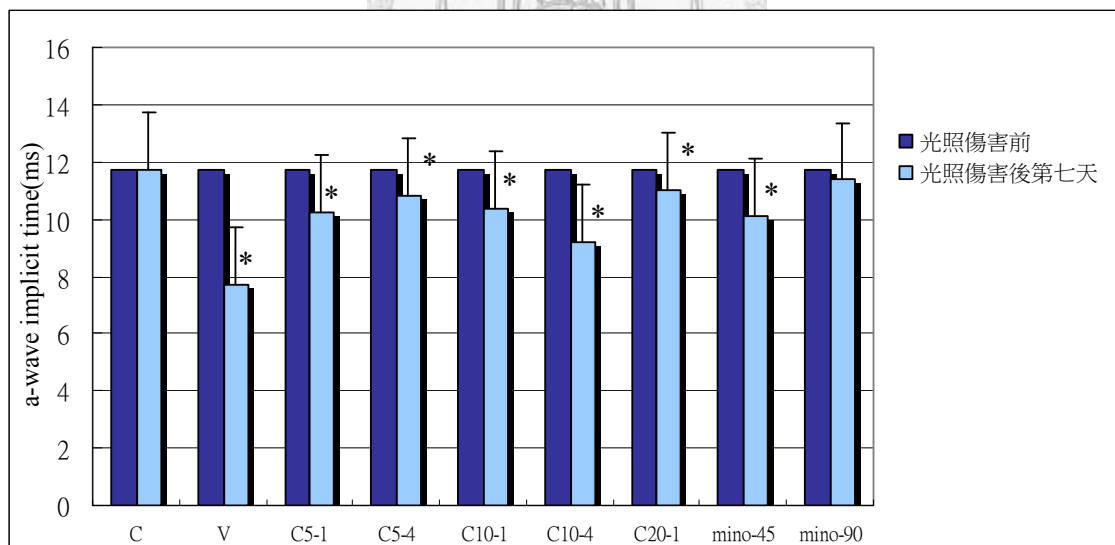


圖 4-4. 光照誘導視網膜病變前與光照傷害後第七天各組視網膜電波圖 a 波時間圖。除了 minocycline 90 mg/kg 組以外，所有組別皆具顯著差異。代表光照對於 a 波出現的時間具有影響力，同時除了 minocycline 90 mg/kg 此組以外，其他藥物組別皆無法達到保護的效果。資料以各組  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示。\*：光照傷害後第七天 a 波出現時間差異  $p < 0.05$ 。

## 第1-2節 視網膜電波圖 b 波之分析結果

表 4-2 以各治療組在光照之後第七天視網膜電波圖中 b 波的振幅，相對於光照傷害前正常視網膜電波圖 b 波振幅做百分比比較(光照傷害後的數值除以光照傷害前的數值)，代表各組可以保留的 b 波振幅百分比。可以發現光照曝露對於視網膜 b 波有明顯的影響，造成振幅的下降。其中以治療對照組下降程度最為嚴重，其他組別除了給予 minocycline 90 mg/ kg/ day 這組以外，皆有一定程度的下降。

圖 4-5 比較經過各組藥物治療後，比起治療對照組可以保留的 b 波振幅。其中除了以 cannabidiol 10 mg/ kg/ day，連續給四天這組沒有顯著差異以外，其他各組皆達顯著差異 ( $p < 0.05$ )，代表對視網膜 b 波振幅具有保護的效果。

另外針對給予 cannabidiol 濃度中對於 b 波保護效果較佳的 5 mg/ kg/ day 與 10 mg/ kg/ day 這兩組，進一步評估劑量與給予次數對於 b 波振幅保護效果的影響。在圖 4-6 可見到利用雙因子變異數分析所得到的結果，可以發現對於視網膜 b 波振幅的保留主要和給予次數相關，單次給予的效果明顯比多次給予的效果佳 ( $p < 0.05$ )。而給予的兩個濃度之間則無顯著的差異。

在觀察視網膜 b 波出現時間方面，圖 4-7 顯示除了 cannabidiol 10 mg/ kg 單次給予這組與 minocycline 兩組以外，所有組別皆具顯著差異。代表光照會造成 b 波出現的時間延長，同時除了上述三組以外，其他藥物組別與治療對照組皆明顯的上升 ( $p < 0.05$ )，同時與治療對照組相比並無顯著的差異，代表對於光照傷害造成的 b 波出現時間延後，無法達到保護的效果。

表 4-2. 光照誘導視網膜病變前與光照傷害後第七天各組視網膜電波圖 b 波振幅百分比

| Rat No. | No. 1  | No. 2  | No. 3 | No. 4  | No. 5 | Mean±SD   |
|---------|--------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| Group   |        |        |       |        |       |           |
| N       | 107.9% | 107.9% | 89.2% | 108.9% | 86.1% |           |
| V       | 6.1%   | 3.1%   | 7.3%  | 7.4%   |       | 6.0±1.0%  |
| C5-1    | 48.5%  | 46.5%  | 48.0% | 60.2%  |       | 50.8±3.2% |
| C5-4    | 36.7%  | 34.9%  | 28.0% | 12.8%  |       | 28.1±5.4% |
| C10-1   | 49.7%  | 58.0%  | 50.0% | 54.9%  |       | 53.2±2.7% |
| C10-4   | 25.0%  | 14.6%  | 25.0% |        |       | 21.5±3.5% |
| C20-1   | 22.6%  | 43.2%  | 41.0% | 41.0%  |       | 37.0±4.8% |
| Mino-45 | 87.0%  | 88.5%  | 73.0% | 77.1%  |       | 81.4±4.9% |
| Mino-90 | 85.3%  | 114.1% | 77.1% | 110.4% |       | 99.0±7.5% |

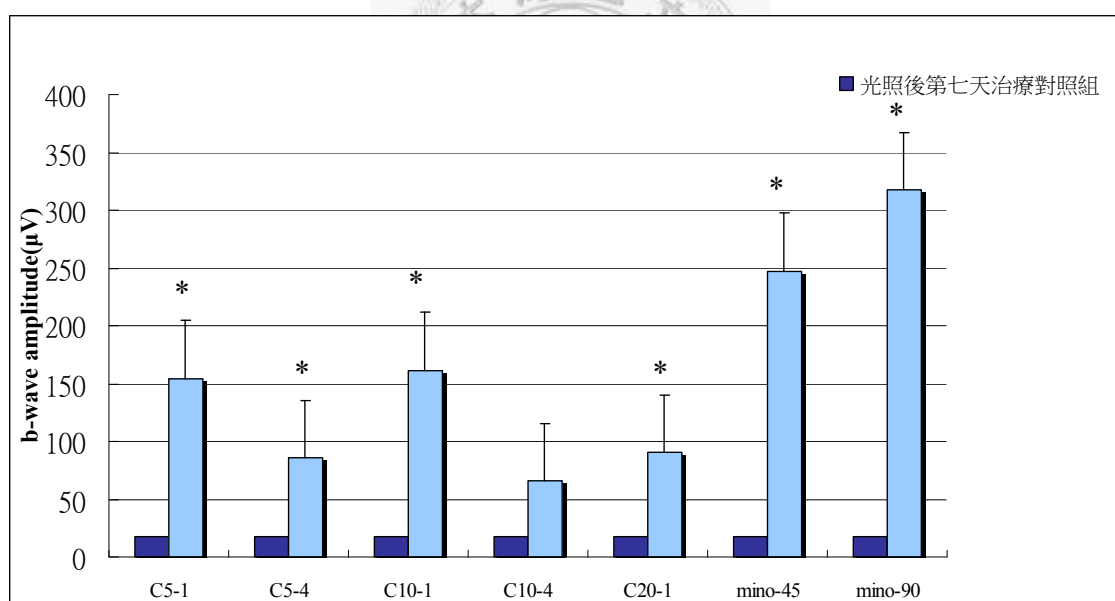


圖 4-5. 光照誘導視網膜病變後第七天各治療組與治療對照組之視網膜電波圖 b 波振幅示意圖。

除了以 cannabidiol 10 mg/ kg 連續給予四天這組以外，其餘各組皆具顯著差異。代表光照曝露對於視網膜電波圖波型中的 b 波會造成影響，但在以 cannabidiol 10 mg/ kg 連續給予 4 天這組以外的治療組皆具有保護效力。資料以各組 mean± SEM 表示。\*：光照傷害後第七天波幅差異 p< 0.05。

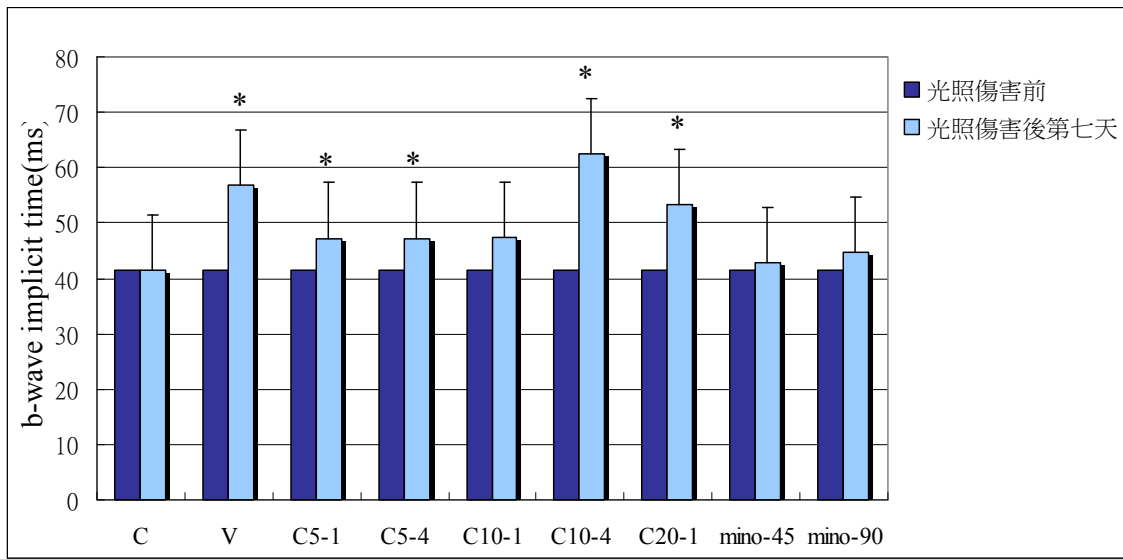


圖 4-6. 光照誘導視網膜病變前與光照傷害後第七天各組視網膜電波圖 b 波時間圖。除了 cannabidiol 10 mg/ kg 單次給予這組與 minocycline 兩組以外，所有組別皆具顯著差異。代表光照對於 b 波出現的時間具有影響力，同時除了上述三組以外，其他藥物組別皆無法達到保護的效果。資料以各組 mean± SEM 表示。\*：光照傷害後第七天 a 波出現時間差異 p< 0.05。

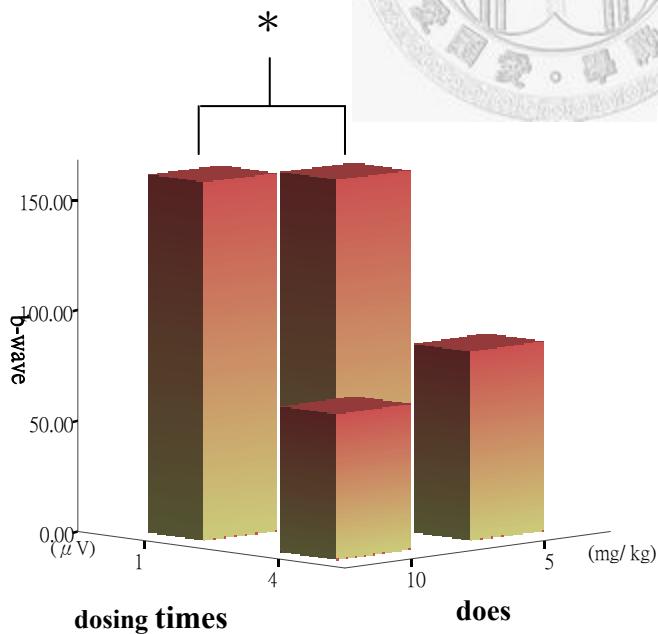


圖4-7. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜電波圖b波的示意圖。dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量。資料以平均值表示。\*：光照傷害後第七天單次給予與多次給予造成波幅的差異p< 0.05。

## 第二節 組織病理學切片評估

### 第2-1節 視網膜各層厚度之分析比較

圖 4-8 可見到在光學顯微鏡觀察下，正常視網膜以及實驗各組別中視網膜的分層結構，可以見到光照傷害對於視網膜的整體厚度造成變薄的影響，尤其是在視網膜外層的部份。其中以治療對照組最為嚴重。圖 4-9-1 及圖 4-9-2 則統計出所有組別觀察的厚度結果，並標出與正常大鼠各層視網膜厚度有顯著差異的治療組。表 4-3、表 4-4、表 4-5、表 4-6、表 4-7 則單就各分層做討論。

在外核層的部份，給予 cannabidiol 10 mg/ kg/ day 單次與連續給予四次、以及 cannabidiol 20 mg/ kg/ day 單次給予這三組，雖然整體相較於正常大鼠的外核層有顯著的差異，但是經過分析之後發現這三組相較於治療對照組亦有顯著差異，代表著這三組雖然還是有外核層的厚度變薄，但比起治療對照組來說，仍有一定程度的保護效果。

除此之外，針對給予 cannabidiol 濃度中對於視網膜電波圖保護效果較佳的 5 mg/ kg/ day 與 10 mg/ kg/ day 這兩組，進一步評估劑量與給予次數對於視網膜各分層保護效果的影響。可以見到經過雙因子變異數分析之後，無論是在濃度或試給予的次數皆對內叢狀層以及外叢狀層不造成影響（圖 4-10、圖 4-12）；另外在內核層以及感光細胞層主要和給予次數相關，單次給予的效果明顯比多次給予的效果佳（ $p < 0.05$ ）。而給予的兩個濃度之間則無顯著的差異（圖 4-11、圖 4-14）；外核層的部份則為給予的次數以及濃度皆會造成其顯著的差異，單次給予的效果明顯比多次給予的效果佳（ $p < 0.05$ ），給予 10 mg/ kg/ day 的濃度對於外核層的保護效果也比給予 5 mg/ kg/ day 的效果好（ $p < 0.05$ ）（圖 4-13）。

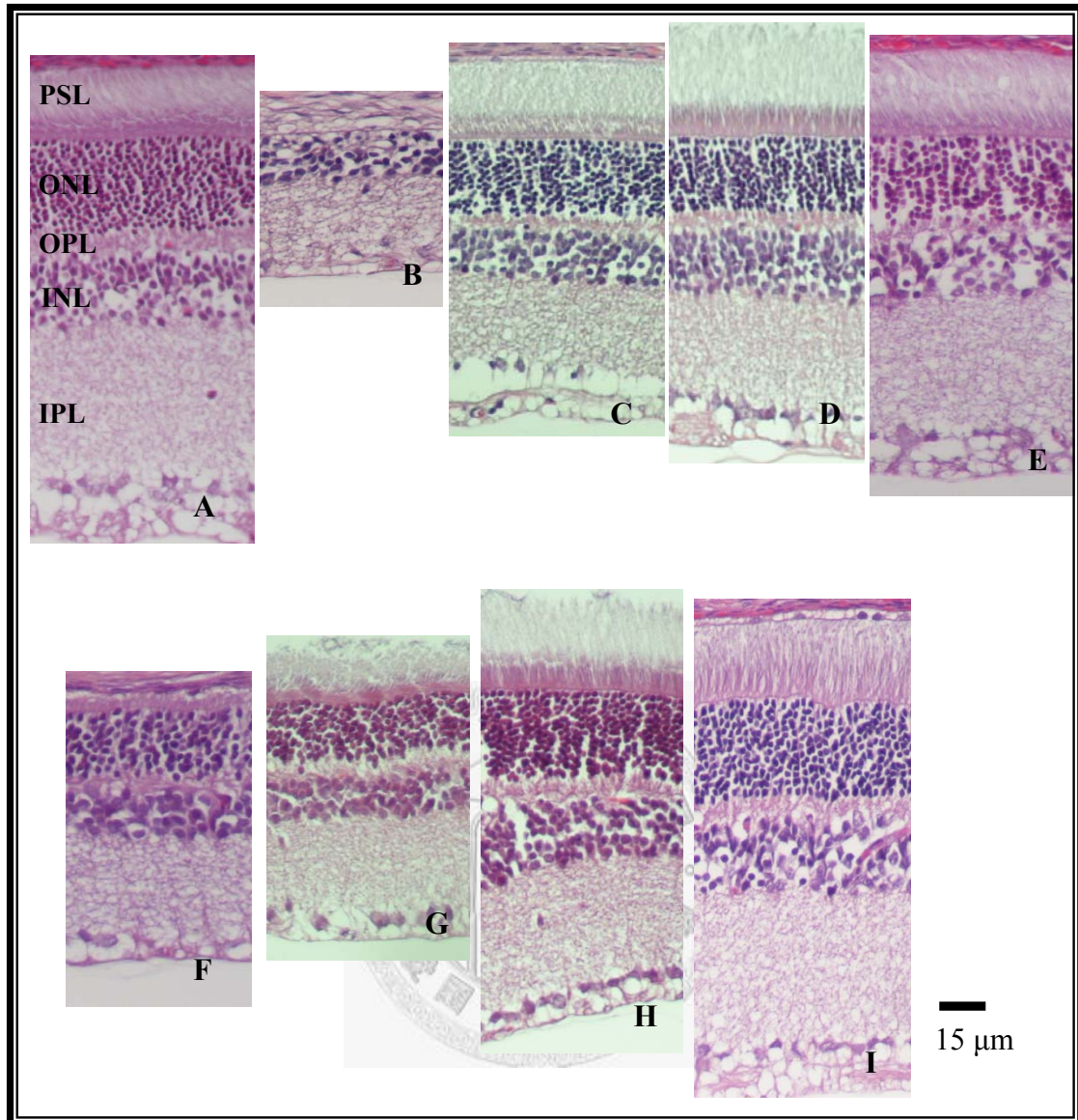


圖 4-8. 大鼠視網膜各層之組織病理型態。

A: 正常大鼠; B: 治療對照組; C: cannabidiol 5 mg/ kg/ day, 單一給予; D: cannabidiol 10 mg/ kg/ day, 單一給予; E: cannabidiol 20 mg/ kg/ day, 單一給予; F: cannabidiol 5 mg/ kg/ day, 連續給予四次; G: cannabidiol 10 mg/ kg/ day, 連續給予四次; H: minocycline 45 mg/ kg/ day, 單一給予; I: minocycline 90 mg/ kg/ day, 單一給予

表 4-3. 內叢狀層 (IPL) 厚度在各組的資料統計比較

| Rat No.<br>Group | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | Mean±SD    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| N                | 66.5  | 71.53 | 89.37 | 76.34 | 69.55 |       | 74.66±4.01 |
| V                | 62.31 | 53.04 | 57.64 | 63.16 | 60.75 | 67.87 | 60.80±2.07 |
| C5-1             | 60.6  | 61.22 | 72.76 | 49.5  | 72.98 | 62.44 | 63.25±3.59 |
| C5-4             | 85.72 | 72.95 | 55.12 | 54.21 |       |       | 67.00±7.59 |
| C10-1            | 57.73 | 61.19 | 64.92 | 62.52 | 72.59 | 64.42 | 63.90±2.03 |
| C10-4            | 53.02 | 69.77 | 36.61 | 60.36 | 56.31 |       | 55.21±5.43 |
| C20-1            | 64.00 | 54.23 | 57.66 | 63.5  |       |       | 59.85±2.36 |
| Mino-45          | 71.38 | 68.57 | 57.27 |       |       |       | 65.74±4.31 |
| Mino-90          | 83.01 | 65.35 | 91.13 | 87.32 | 63.83 | 53.38 | 74.00±6.21 |

N：正常大鼠；V：治療對照組；C5-1：cannabidiol 5 mg/ kg/ day，單次給予；C5-4：cannabidiol 5 mg/ kg/ day，連續給予 4 次；C10-1：cannabidiol 10 mg/ kg/ day，單次給予；C10-4：cannabidiol 10 mg/ kg/ day，連續給予 4 次；C20-1：cannabidiol 20 mg/ kg/ day，單次給予；Mino-45：minocycline 45 mg/ kg/ day，單次給予；Mino-90：minocycline 90 mg/ kg/ day，單次給予；IPL：inner plexiform layer；INL：inner nuclear layer；OPL：outer plexiform layer；ONL：outer nuclear layer；PSL：photoreceptor segment layer。No. 1 至 No. 6 代表不同大鼠視網膜內叢狀層厚度 (μm) 的數據結果。

表 4-4. 內核層 (INL) 厚度在各組的資料統計比較

| Rat No.<br>Group | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | Mean±SD    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| N                | 33.17 | 31.74 | 40.99 | 36.56 | 40.63 |       | 36.62±1.88 |
| V                | 24.01 | 24.89 | 22.61 | 18.45 | 16.05 | 25.49 | 21.92±1.56 |
| C5-1             | 35.76 | 34.42 | 38.65 | 25.09 | 38.86 | 34.39 | 34.53±2.05 |
| C5-4             | 25.79 | 30.01 | 26.96 | 21.91 |       |       | 26.17±1.67 |
| C10-1            | 34.22 | 35.07 | 42.23 | 32.07 | 44.21 | 29.15 | 36.16±2.40 |
| C10-4            | 23.33 | 33.24 | 24.29 | 35.43 | 25.07 |       | 28.27±2.51 |
| C20-1            | 31.81 | 29.09 | 26.76 | 37.48 |       |       | 31.29±2.31 |
| Mino-45          | 35.07 | 33.93 | 27.95 |       |       |       | 32.32±2.21 |
| Mino-90          | 38.23 | 24.79 | 37.24 | 41.12 | 34.42 | 27.88 | 33.95±2.59 |

N：正常大鼠視網膜厚度；其餘各組為光照傷害之後第七天的視網膜厚度。No. 1 至 No. 6 代表不同大鼠視網膜內核層厚度 (μm) 的數據結果。

表 4-5. 外叢狀層 (OPL) 厚度在各組的資料統計比較

| Rat No.<br>Group | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | Mean±SD    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| N                | 11.21 | 10.91 | 12.89 | 13.23 | 13.46 |       | 12.34±0.53 |
| V                | 4.87  | 6.35  | 5.63  | 4.47  | 4.32  | 9.18  | 5.80±0.74  |
| C5-1             | 10.45 | 11.28 | 10.33 | 9.16  | 16.41 | 14.72 | 12.06±1.16 |
| C5-4             | 14.49 | 11.06 | 9.3   | 8.53  |       |       | 10.85±1.33 |
| C10-1            | 11.7  | 9.43  | 11.41 | 13.03 | 16.83 | 15.17 | 12.93±1.1  |
| C10-4            | 9.17  | 14.36 | 8.1   | 9.15  | 11.13 |       | 10.38±1.11 |
| C20-1            | 12.65 | 12.25 | 10.63 | 13.45 |       |       | 12.25±0.59 |
| Mino-45          | 14.64 | 14.54 | 14.08 |       |       |       | 14.42±0.17 |
| Mino-90          | 15.01 | 11.33 | 17.18 | 14.81 | 11.98 | 13.52 | 13.97±0.88 |

N：正常大鼠視網膜厚度；其餘各組為光照傷害之後第七天的視網膜厚度。No. 1 至 No. 6 代表不同大鼠視網膜外叢狀層厚度 (μm) 的數據結果。



**表 4-6. 外核層 (ONL) 厚度在各組的資料統計比較**

| Rat No.<br>Group | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | Mean±SD    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| N                | 53.53 | 56.82 | 49.09 | 49.64 | 51.96 |       | 52.21±1.40 |
| V                | 14.98 | 25.2  | 10.7  | 11.06 | 10    | 20.99 | 15.49±2.57 |
| C5-1             | 47.35 | 49.17 | 32.4  | 29.6  | 42.74 | 43.47 | 40.79±3.27 |
| C5-4             | 14.81 | 17.83 | 25.98 | 17.56 |       |       | 19.05±2.41 |
| C10-1            | 38.8  | 35.35 | 41.33 | 41.06 | 49.69 | 50.54 | 42.80±2.48 |
| C10-4            | 33.6  | 39.23 | 33.3  | 30.14 | 31.47 |       | 33.55±1.55 |
| C20-1            | 38.96 | 38.47 | 33.23 | 34.22 |       |       | 36.22±1.46 |
| Mino-45          | 50.08 | 49.95 | 44.63 |       |       |       | 48.22±1.80 |
| Mino-90          | 49.3  | 45.19 | 56.39 | 48.01 | 50.18 | 49.15 | 49.70±1.51 |

N：正常大鼠視網膜厚度；其餘各組為光照傷害之後第七天的視網膜厚度。No. 1 至 No. 6 代表不同大鼠視網膜外核層厚度 (μm) 的數據結果。



**表 4-7. 感光細胞層 (PSL) 厚度在各組的資料統計比較**

| Rat No.<br>Group | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | Mean±SD    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| N                | 49.22 | 37.88 | 44.09 | 44.16 | 42.75 |       | 43.62±1.81 |
| V                | 18.09 | 22.31 | 4.82  | 7.32  | 6.56  | 31.04 | 15.02±4.30 |
| C5-1             | 52.12 | 61.75 | 40.77 | 19.58 | 38.73 | 35.03 | 41.33±5.93 |
| C5-4             | 10.52 | 18.54 | 18.8  | 11.41 |       |       | 14.82±2.23 |
| C10-1            | 45.81 | 41.13 | 24.78 | 40.48 | 58.28 | 47.16 | 42.94±.47  |
| C10-4            | 30.19 | 41.82 | 30.14 | 28.15 | 26.29 |       | 31.32±2.72 |
| C20-1            | 31.38 | 38.51 | 33.74 | 35.97 |       |       | 34.90±1.53 |
| Mino-45          | 38.59 | 33.52 | 32.81 |       |       |       | 34.97±1.82 |
| Mino-90          | 41.9  | 35.57 | 42.73 | 48.44 | 34.43 | 45.24 | 41.39±2.23 |

N：正常大鼠視網膜厚度；其餘各組為光照傷害之後第七天的視網膜厚度。No. 1 至 No. 6 代表不同大鼠視網膜感光細胞層厚度 (μm) 的數據結果。

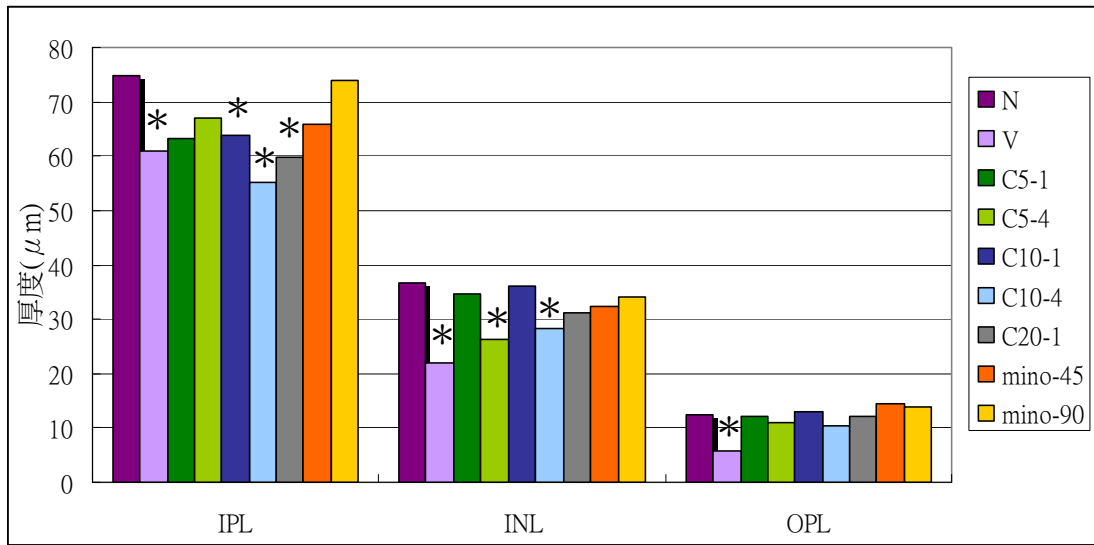


圖 4-9-1. 視網膜各層厚度在不同藥物以及劑量之下的比較

IPL : inner plexiform layer ; INL : inner nuclear layer ; OPL : outer plexiform layer 。

資料以各組平均值表示。\* : 光照傷害後第七天與正常視網膜厚度差異  $p < 0.05$  。

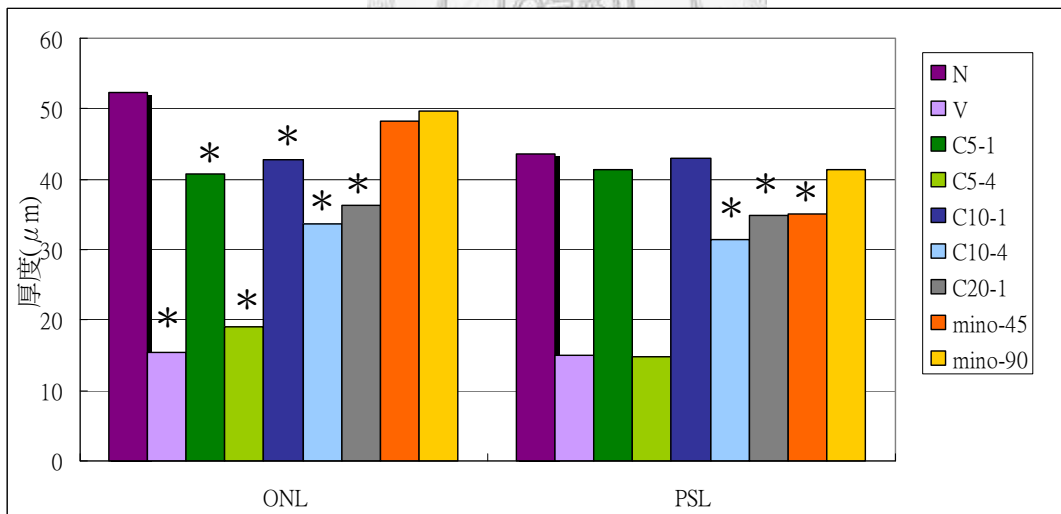


圖 4-9-2. 視網膜各層厚度在不同藥物以及劑量之下的比較

ONL : outer nuclear layer ; PSL : photoreceptor segment layer 。

資料以各組平均值表示。\* : 光照傷害後第七天與正常視網膜厚度差異  $p < 0.05$  。

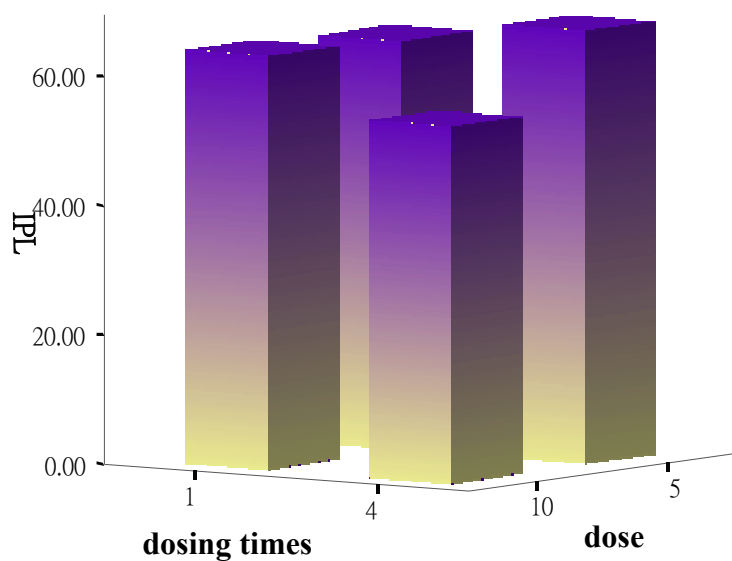


圖4-10. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜內叢狀層比較。IPL：inner plexiform layer；dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量（mg/kg/day）。資料以平均值表示。

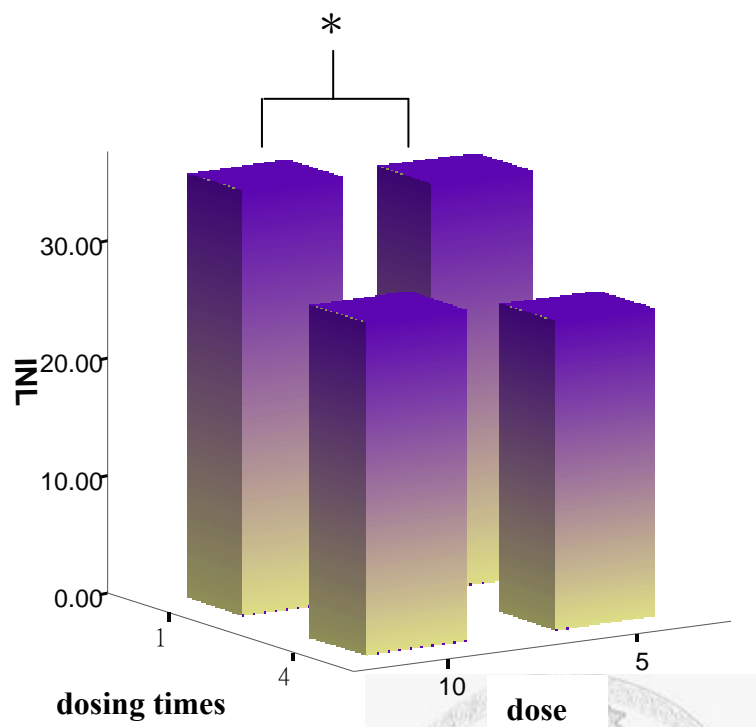


圖4-11. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜內核層比較。INL：inner nuclear layer；dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量（mg/ kg/ day）。資料以平均值表示。\*：光照傷害後第七天單次給予與多次給予造成內核層厚度有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

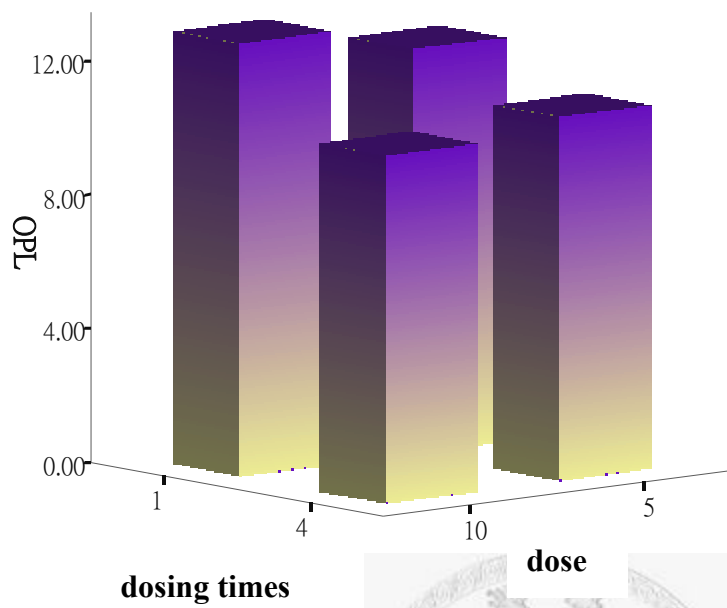


圖4-12. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜外叢狀層比較。OPL：outer plexiform layer；dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量（mg/kg/day）。資料以平均值表示。

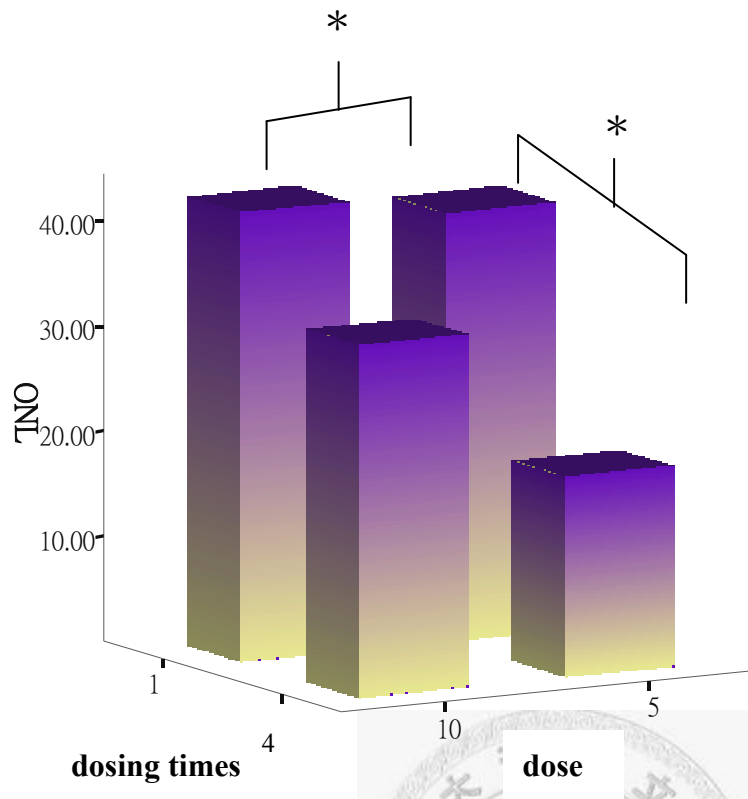


圖4-13. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜內核層比較。ONL：outer nuclear layer；dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量（mg/ kg/ day）。資料以平均值表示。\*：光照傷害後第七天無論在劑量還是給予次數上皆造成內核層厚度有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

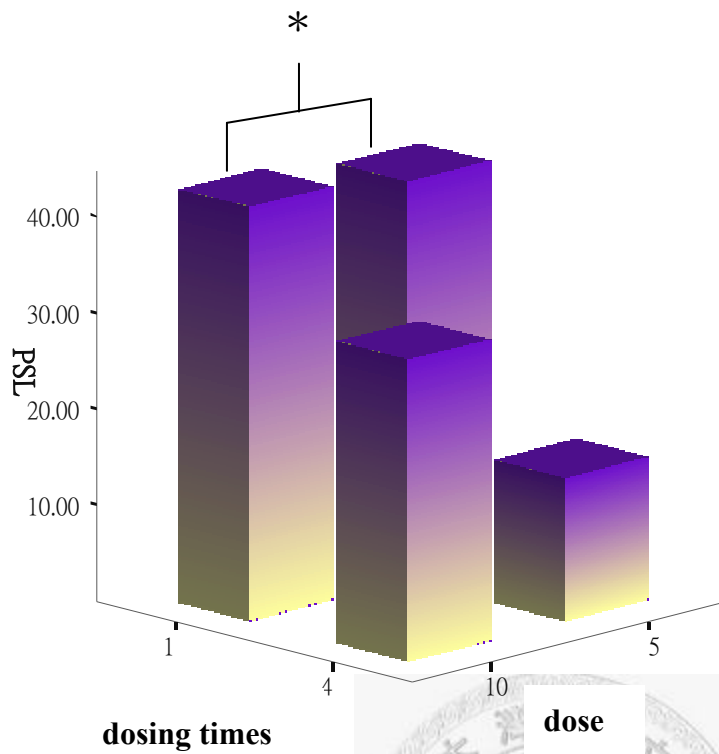


圖4-14. 光照誘導傷害後第七天，給予cannabidiol不同次數與劑量下視網膜感光細胞層比較。PSL：photoreceptor segment layer；dosing times：投藥次數；dose：投藥劑量（mg/ kg/ day）。資料以平均值表示。\*：光照傷害後第七天單次給予與多次給予造成感光細胞層厚度有顯著差異（ $p<0.05$ ）。

## 第2-2節 視網膜型態之檢查結果

圖 4-15 可見到光照傷害後的視網膜外核層除了厚度減少以外，外核層的細胞排列鬆散、圖 4-16 則可見到外核層與視網膜色素上皮融合並出現卵圓形的空洞樣。代表視網膜的外層受到嚴重的傷害。

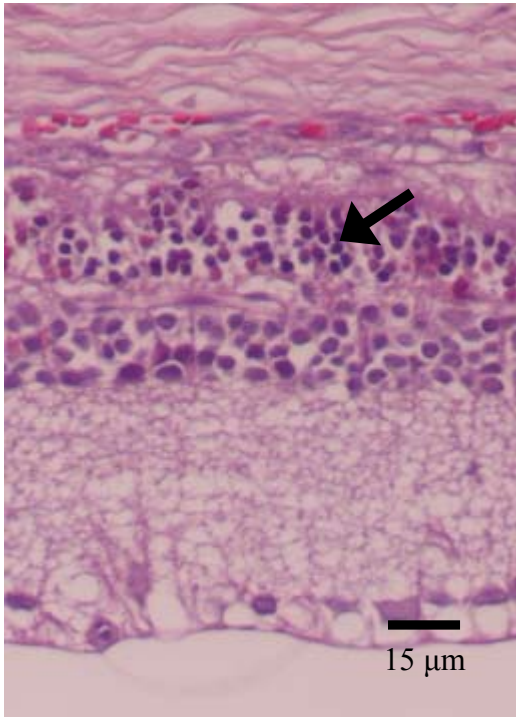


圖 4-15. 視網膜外核層排列凌亂且疏鬆。

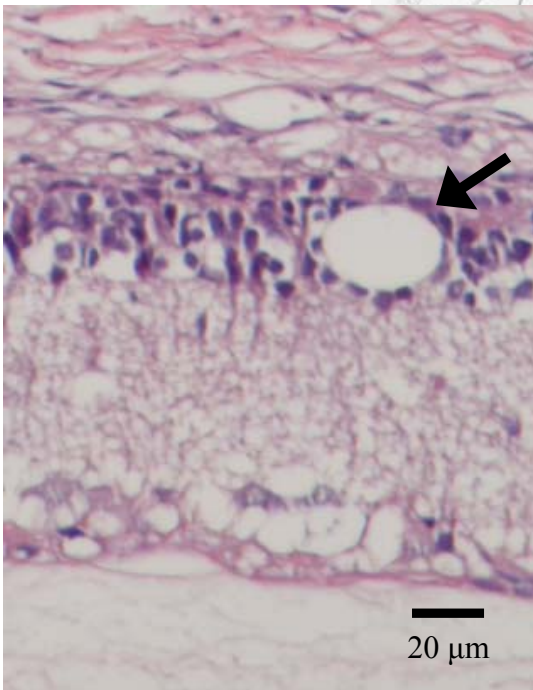


圖 4-16. 視網膜外核層與視網膜色素上皮融合並出現卵圓形的空洞樣。



### 第三節 微膠細胞免疫組織化學染色之分析

在本研究以光照傷害結束後每 12 個小時為一時間點，對於治療對照組進行評估，圖 4-17 統計活化的微膠細胞出現的個數，發現在光照曝露結束後第 12 個小時，視網膜的部份就會明顯開始出現活化的微膠細胞；而在第 24 到 36 小時則出現最大量的微膠細胞；第 36 到 48 小時之後則開始消退；第 60 到 72 小時數量則非常少甚至是觀察不到；光照結束後第七天則是完全觀察不到微膠細胞出現在視網膜外層的範圍。圖 4-18 顯示經過免疫組織化學染色後，視網膜在不同時間點表現的微膠細胞表現。

另外針對各個時間點下，治療組與治療對照組的差異做比較。在這裡主要根據視網膜電波圖的結果較佳的治療組別來做進一步的微膠細胞的偵測，包括單次給予 cannabidiol 5 mg/kg/day 與 10 mg/kg/day、單次給予 minocycline 45 mg/kg/day 與 90 mg/kg/day 四組。

在圖 4-19 可以見到光照傷害結束後第 24 個小時微膠細胞數量的變化，發現除了單次給予 minocycline 45 mg/kg/day 這組以外，其他組別與治療對照組皆達到顯著差異 ( $p < 0.05$ )，代表具有減少微膠細胞活化表現的效果。

圖 4-20 則可以見到在光照傷害結束後第 48 個小時微膠細胞數量的變化，發現只有給予 cannabidiol 的兩組具有顯著的差異 ( $p < 0.05$ )，代表具有減少微膠細胞表現的效果。同時相對於 cannabidiol 組別，給予 minocycline 的兩組其微膠細胞的表現甚至比治療對照組還要多。

圖 4-21 為在光照傷害結束後第 72 個小時微膠細胞數量的變化，結果顯示所有組別皆與治療對照組不具有任何差異，但這也可能是因為在這個時間點的微膠細胞已經不太表現而造成的影響。同樣的在這個時間點也可以發現，給予 minocycline 的兩組其微膠細胞的表現甚至比治療對照組還要多。

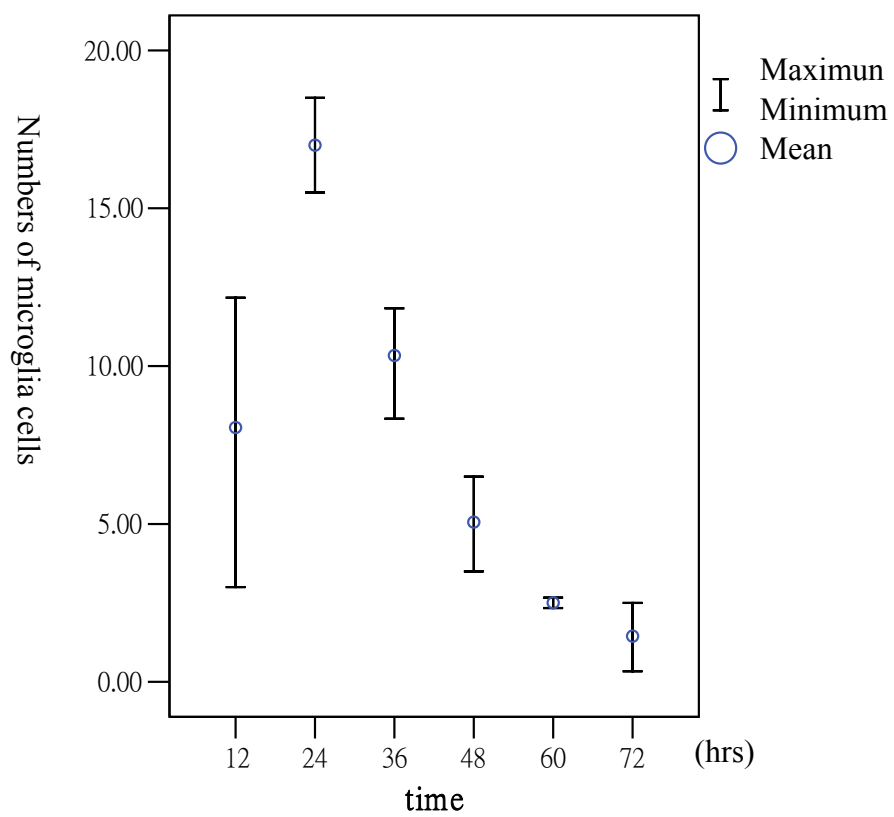


圖 4-17. 光照傷害後在不同時間點，活化的微膠細胞個數。



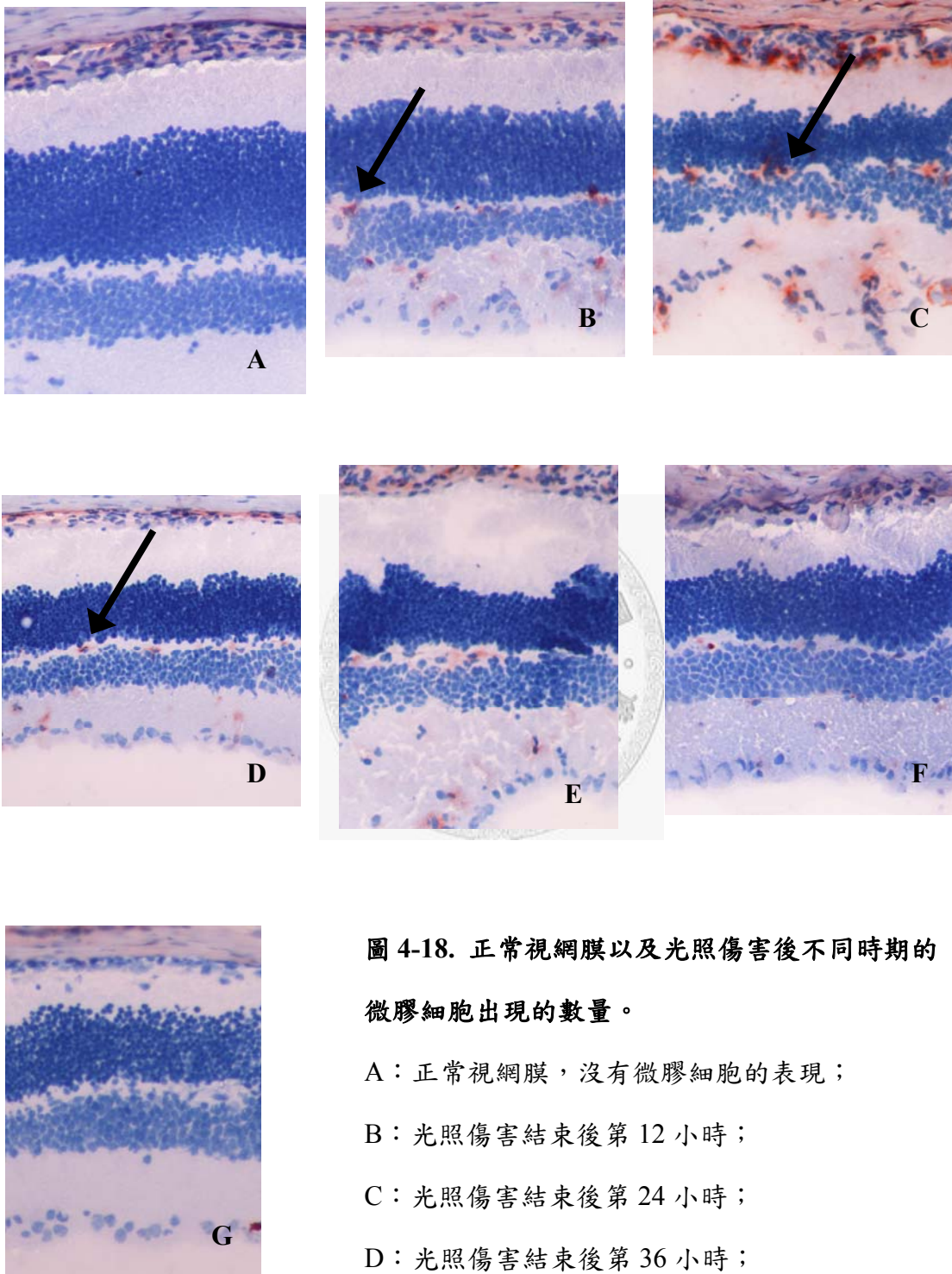


圖 4-18. 正常視網膜以及光照傷害後不同時期的微膠細胞出現的數量。

A：正常視網膜，沒有微膠細胞的表現；

B：光照傷害結束後第 12 小時；

C：光照傷害結束後第 24 小時；

D：光照傷害結束後第 36 小時；

E：光照傷害結束後第 48 小時；

F：光照傷害結束後第 60 小時；

G：光照傷害結束後第 72 小時；

箭頭：活化的微膠細胞。

—  
10 μm

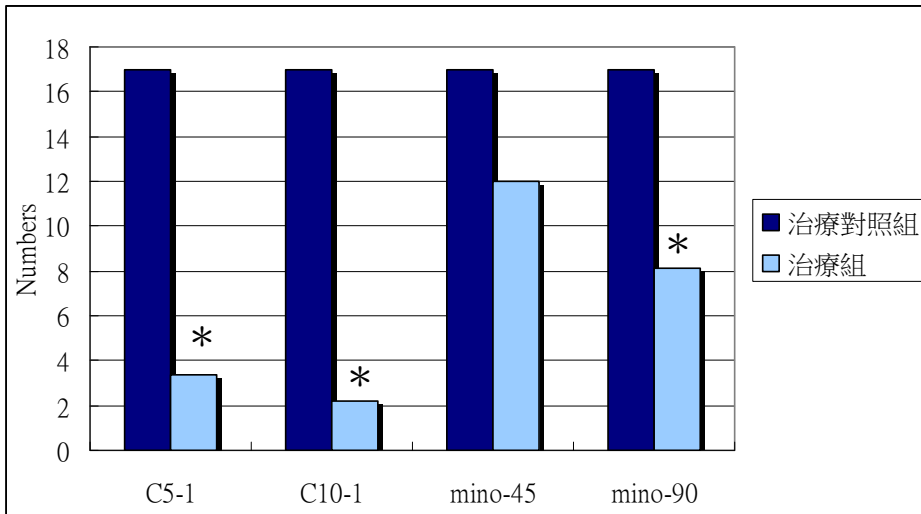


圖 4-19. 光照傷害之後 24 小時各治療組與治療對照組微膠細胞出現的數量。各組資料以平均值表示。\*：光照傷害後 24 小時其活化微膠細胞細胞數目與治療對照組有差異 (p<0.05)。

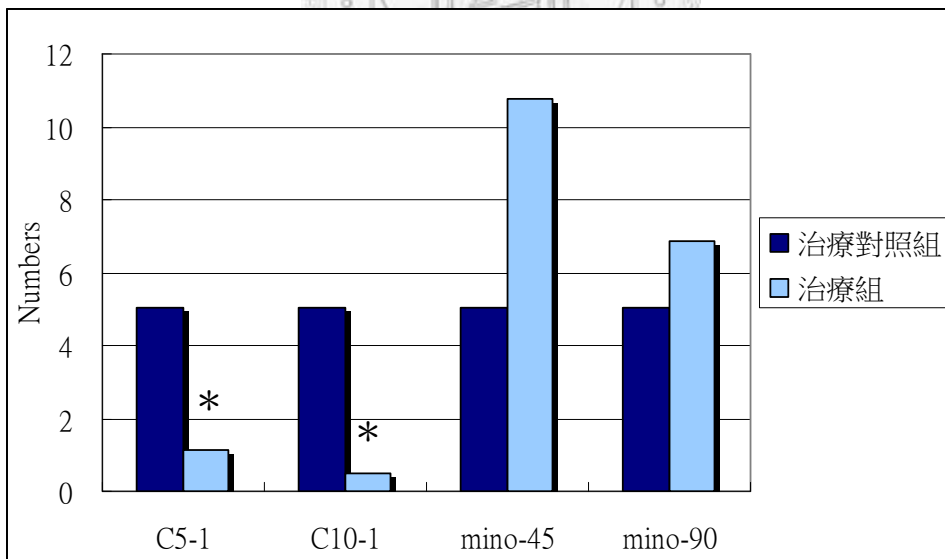


圖 4-20. 光照傷害之後 48 小時各治療組與治療對照組微膠細胞出現的數量。各組資料以平均值表示。\*：光照傷害後 48 小時其活化微膠細胞細胞數目與治療對照組有差異 (p<0.05)。

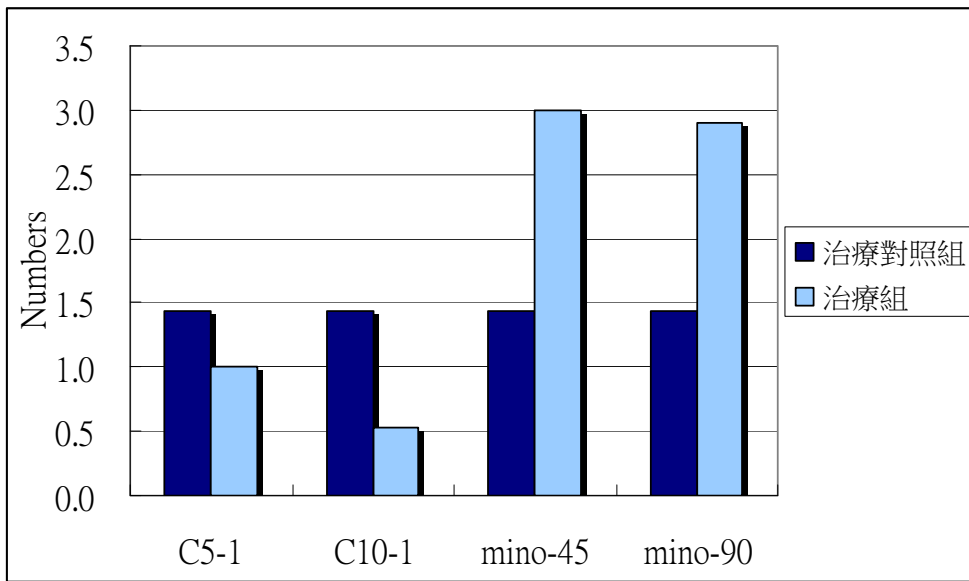


圖 4-21. 光照傷害之後 72 小時各治療組與治療對照組微膠細胞出現的數量。

各組資料以平均值表示。



## 第五章 討論

### 第一節 光誘導視網膜退化大鼠模式之建立

基因變異造成視網膜退化的疾病除了在犬隻以外，在人也有類似的疾病稱為色素視網膜炎。而無論是在犬隻或是人，想要直接以患者進行實驗性的操作皆有相當的困難度，因此建立一個有效的實驗動物模式在研究此視網膜退化相關問題時是很重要的。

在 1924 年 Keeler 等人提出利用桿狀感光細胞 PDE6 基因突變的 rd1 小鼠建立視網膜退化疾病的模式，經此產生突變的小鼠在出生 10 天後桿狀細胞會逐漸退化，數月後椎狀細胞也會二次性的逐漸退化(Sancho-Pelluz *et al.*, 2008)。除此之外也有參考在人已發現突變的基因，來進行此基因 knock-out 的實驗動物模式，例如 rhodopsin knock-out 的實驗動物可以用以研究視紫質 (rhodopsin) 突變造成的視網膜退化症。

近年來逐漸確認在視網膜退化疾病中，細胞是以凋亡的方式死亡，但是藉由疾病誘導的視網膜退化動物模式可能同時伴隨發展中的細胞死亡，因而遮蔽了細胞凋亡的機制，造成研究上的困難。因此利用過多光照誘導的感光細胞退化動物模式逐漸被廣泛的使用，主要是因為使用此模式除了快速、同步誘導桿狀細胞以及椎狀細胞退化以外，更具備可以依照不同的光照強度以及時間來調整傷害的程度等優點(Hao *et al.*, 2002)。

自從 1966 年 Noell 提出光誘導視網膜病變的動物模式之後，有許多不同的傷害模式逐漸被建立，主要為光源的差異以及暴露時間的改變，其中光源選擇的差異如下敘述：

1. 選擇波長介於 400-760 nm 的可見光（螢光白燈）來模仿一般日照，同時也可以用來模擬人在暴露了過多的日照形成的視網膜疾病，例如老年性黃斑部病變。
2. 選擇介於波長 490~580 nm 的綠光，被認為與視紫質吸收光線的光譜幅度

相符。

3. 之前研究證實，選擇波長  $403\pm 10$  nm 的藍光（近乎於紫外線中的 UVA），這個範圍內的短波長藍光會造成桿狀、椎狀細胞以及視網膜色素上皮細胞的傷害，同時也發現介於  $550\pm 10$  nm 的綠光，被認為其傷害性較低 (Norren & Schellekens *et al.*, 1990; Grimm *et al.*, 2001)。

此外，暴露時間與光源的選擇有相當大的相關性。一般來說，若是選擇具有高能量的藍光，只需要暴露很短的時間（幾分鐘到幾十分鐘內）；相對的選擇綠光或是白光可能需要幾個小時或是幾天。同時 Organisciak 等人證實在大鼠模式下，以同樣強度的光照，間隔的光照曝露比起連續的光照曝露造成的感光細胞傷害更為嚴重 (Organisciak *et al.*, 1989)。

照光的方式，除了將實驗動物飼養於飼養籠內，以自然曝露的方式接受光照以外，部分的實驗設計配合將實驗動物麻醉，並以高照度的光照直接照射於眼睛的部位，這種方式的優點在於可以減少其他因子對於光照的影響 (Grimm *et al.*, 2001)。

在本實驗為了模擬一般的日照曝露和光照週期，選擇了白光，並以 12 小時亮/ 12 小時暗的光照週期進行視網膜退化的模擬模式。在前導試驗中，藉由評估曝露在不同光照強度以及時間之下的視網膜功能性和病理性的變化，來決定使用的標準。其中以低於 1000 lux 左右的光照強度進行總共 24 小時的曝露之後，是無法達到明顯的視網膜傷害；而在 1200-1400 lux 範圍內的光照強度進行總共 24 小時的曝露可以達到嚴重的視網膜傷害；若以 1500-2000 lux 的光照進行總共 24 小時的曝露，則會形成過度的傷害程度，可能因此影響藥物是否達到保護的差異性，較不適合用在此實驗中。

## 第二節 神經保護藥物的選擇

本研究中選擇使用的藥物大麻二酚 (cannabidiol) 為大麻生物鹼

(cannabinoids)的一種，同時也是大麻中最主要的非中樞神經依賴性的成分，除了神經方面疾病的治療效果以外，近十年研究發現具有抗發炎及抗氧化的效果，並被認為因此具有神經保護的效果(Hampson *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2007)。近年來在許多不同的實驗動物模式，包括大腦的缺血性傷害、阿茲罕莫症 (Alzheimer disease) 或是乙醇誘發的神經毒性，皆發現大麻二酚具有神經保護的效果(Braida *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2004; Scuderi *et al.*, 2008); 在視網膜方面，則有報導在糖尿病模式、或是以 glutamate、N-methyl-D-aspartic acid 誘發的神經毒性模式下，被證實有降低視網膜神經毒性的作用 (El-Remessy *et al.*, 2006; El-Remessy *et al.*, 2008)。雖然大麻二酚確實的效果與機制到目前都尚未有定論，但是根據至今被發現的作用機制，推測其具有的抗氧化及抗發炎作用、抗細胞凋亡的效果，可以應用在由光照誘導的感光細胞凋亡模式中。本研究的實驗目的在於評估使用大麻二酚在光誘導視網膜病變的模式下，是否可以達到臨床上的神經保護效果，並且嘗試定量具有神經保護效果的濃度，同時評估致效的可能機制。

在探討神經傷害的藥物中，常被使用的藥物為類固醇類的藥物，其中 methylprednisolone 無論在臨床或是實驗的模式下，皆有相關的研究發現具有神經保護的作用(Slivka & Murphy *et al.*, 2001)，一般認為其藉由下列的機制而達到穩定細胞膜的功效，包括：(1) 抑制局部的水腫，因而減緩壓迫造成的二次性神經元傷害；(2) 抑制自由基引發的脂質超氧化的現象；(3) 抑制部分細胞激素的合成；(4) 維持組織灌流；(5) 減緩細胞內鈣離子的堆積。儘管如此，類固醇類藥物在做為神經保護藥物的使用上仍是充滿爭議的，雖然在臨床上經常使用 methylprednisolone 作為視神經傷害的治療藥物，然而實際上的效用卻尚未被詳細的探討。在一篇研究中，以實驗動物的模式探討 methylprednisolone 治療視神經傷害的神經保護效果，結果並沒有發現給予 methylprednisolone 有達到保護視網膜細胞或是保護視力的效果(Ohlsson *et al.*,



2004)。加上類固醇在視網膜方面的相關研究並不多，因此在本實驗中並沒有以類固醇類藥物做為與大麻二酚相比較的藥物。

本研究中用來做大麻二酚效果比較的藥物 minocycline，為四環黴素的衍生物之一，近十年來除了被應用作為感染的治療以外，也被廣泛的使用作為抗發炎、抗凋亡（antiapoptosis）以及免疫調節的藥物。此外在過去五年不斷的有研究發現 minocycline 具有良好的神經保護的效果，包括許多種神經退化性疾病、急性脊髓或腦部創傷、以及腦部缺血性壞死的實驗動物模式等 (Yrjänheikki *et al.*, 1998; Zemke & Majid *et al.*, 2004; Kima & Suha *et al.*, 2009)，在視網膜的方面，近年來無論是在實驗動物模式或是體外試驗模式下，亦有相關的研究證實 minocycline 具有保護視網膜細胞的功能，其中已有研究指出在光照誘導視網膜病變的模式下以 minocycline 進行治療，具有不錯的感光細胞保護的效果(Baptiste *et al.*, 2004; Zhang & Lei *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2007)。由於 minocycline 尚未被廣泛的使用於臨床上作為視網膜神經保護的藥物，因此在本研究中會再次評估 minocycline 應用於光誘導之視網膜病變模式下，臨床上以及細胞學上的神經保護效果，並且可以作為大麻二酚在神經保護效果上的比較。

### 第三節 大麻二酚的藥效評估

#### 第 3-1 節 視網膜電波圖之結果討論

##### A. 視網膜電波圖之變化

由於視網膜電波圖為非常敏感的視網膜檢測工具，可以在尚未出現臨床症狀前就有一定程度的變化，因此不管是在病患或是實驗動物，皆適合用來評估視網膜的功能。在本研究中亦使用視網膜電波圖來評估視網膜的功能，以及用作評估藥物治療效果的方法。之前的文獻提到，由於視網膜電波圖中的 a 波以及 b 波振幅與外層存活的感光細胞有高度的

相關性，因此在光照形成視網膜傷害後可以觀察到 a 波以及 b 波的振幅有明顯的變小，以及 b 波的斜率增大等現象，同時越強的光照也會造成越嚴重的振幅減小。除此之外暗視野下的 b 波最大振幅在取對數之後，被認為與存活的感光細胞核個數具有高度相關性(Sugawara *et al.*, 2000)。

本研究中發現大鼠在進行光照曝露之後第七天，於視網膜電波圖中的 a、b 波形皆受到影響。其中 a 波發生的時間提早、b 波發生的時間延遲、以及 a、b 波皆有振幅上的減小，其中又以 b 波振幅下降的幅度為大。由於暗視野下的最大 b 波振幅中，比起桿狀細胞，主要是因為椎狀細胞造成感光細胞的喪失，因此可以推測在本研究中在光照誘導之後，以椎狀感光細胞受到較大的傷害，與之前的研究結果顯示一致。但在本研究中並沒有細分桿狀細胞以及椎狀細胞的功能上變化，因此若要進一步探討，可以分開進行亮視野以及暗視野不同環境條件下的視網膜電波圖，來深入了解光照傷害與藥物對於桿狀以及椎狀細胞的影響。

#### B. 大麻二酚對於視網膜電波圖之影響

之前的研究對於大麻二酚給予的濃度所能達到神經保護效果尚未有定論，其中以糖尿病實驗大鼠模式的研究提出，以 10 mg/ kg/ day 的劑量，每兩天給予一次，連續給予一個禮拜以上可以達到良好的神經保護效果(El-Remessy *et al.*, 2006)；以 NMDA 誘發視網膜神經毒性的模式下則是給予大麻二酚 2 mg/ kg/ day 做治療，發現具有神經保護的功能(El-Remessy *et al.*, 2003)。因此根據之前文獻的結果，在本研究中選擇三種不同濃度分別為 5、10、20 mg/ kg/ day，並依照初步結果來選擇適合的劑量作進一步給予不同次數的探討。

從本研究的結果可以發現，在視網膜電波圖 a 波的部份，僅有以大麻二酚 5 mg/kg/ day 連續給予四次的這組與治療對照組相比沒有顯著差異，

其餘各組相較於治療對照組皆有顯著的差異；在視網膜電波圖 b 波的部分，則是在 10 mg/kg/ day 連續給予四次的這組與治療對照組相比沒有顯著差異。因此我們可以發現，在光誘導視網膜病變的模式下，以大麻二酚作為治療的確可以達到神經保護的效果，但是給予大麻二酚的濃度以及次數這兩個因子皆會影響保護的效果

其中有趣的是，劑量的高低與 a、b 波振幅大小的關係並非呈現正向線性關係。可以發現在 5、10、20 mg/ kg/ day 三個劑量中，以 10 mg/ kg/ day 這個劑量有較佳的 a、b 波振幅的保護效果。同時觀察在 5、10 mg/ kg/ day 這兩個劑量下，連續給予四次之後，又以高劑量、多次給予的這個組別在視網膜電波圖的振幅上有明顯的下降。在一篇以腦部缺血性傷害的研究中嘗試使用大麻二酚 1.25、2.5、5、10、20 mg/ kg/ day 五種不同的劑量去評估神經保護的效用，同樣也發現其中以 5 mg/ kg/ day 這組的治療效果最佳，整體評估發現治療的效果與劑量呈現鐘型的曲線結果，而非正向的線性關係(Braida *et al.*, 2003)；類似的結果也曾被報導在利用大麻二酚作為治療關節炎的大鼠模式上(Costa *et al.*, 2004)。這個結果可能是代表著大麻二酚給予的濃度需要介於固定的範圍內，才能達到神經保護的效果。

### C. Minocycline 對於視網膜電波圖之影響

本研究發現以 minocycline 作為光誘導視網膜病變的藥物，無論是視網膜電波圖的 a 波或是 b 波振幅，皆有良好的保留，同時相對於治療對照組皆有顯著的差異。因此證實 minocycline 在此模式下具有不錯的神經保護效果，與之前的研究結果符合(Zhang & Lei *et al.*, 2004)。除此之外，在之前文獻提出在腦部急性創傷或是缺血性傷害時給予 45 mg/ kg/ day 的 minocycline 可以達到神經保護的效果(Sanchez Mejia *et al.*, 2001)；而在另一篇同樣以光誘導視網膜病變的研究中則是以高劑量 90 mg/ kg/ day 連續

給予，而達到神經保護的功能(Zhang & Lei *et al.*, 2004)。在本研究發現給予 90 mg/ kg/ day 不管是在 a 波或是 b 波的振幅表現皆比濃度 45 mg/ kg/ day 的效果來的佳。

### 第 3-2 節 組織病理型態變化之結果討論

#### A. 視網膜厚度之評估

由於光誘導之視網膜病變主要經由視紫質 (rhodopsin) 傳導，因此視網膜的外層 (outer segment) 為傷害最嚴重的地方，Noell 等人指出，經由光照的曝露之後會依傷害程度造成程度不一的感光細胞層與外核層的厚度減少，同時外核層的細胞排列凌亂或呈現空洞。因此在進行組織病理的判讀時，會以外核層以及感光細胞層的變化為最主要觀察的病變區(Noell *et al.*, 1966)。

本研究的治療對照組的確可以明顯觀察到感光細胞層的消失，造成外核層與視網膜色素上皮的融合、同時外核層厚度也有下降的現象。若針對外核層與感光細胞層去細分，可以發現除了以大麻二酚 5 mg/kg/ day 連續給予四次的這組以外，其他無論是以大麻二酚或是 minocycline 治療的組別在這兩層細胞的厚度計算上，皆與治療對照組有顯著的差異，代表這兩個藥物在光誘導視網膜病變的模式下具有神經保護的效果。同樣的，在觀察大麻二酚以 5、10 mg/ kg/ day 這兩個濃度下，連續給予四次的治療結果，發現以高劑量、多次給予的這個組別在厚度的保存上效果較差，與視網膜電波圖檢測結果相符合。除此之外，在本研究的結果中也發現，除了外核層以及感光細胞層之外，在內叢狀層以及內核層也會有厚度下降的變化，其中又以光照傷害後的內核層與正常大鼠視網膜相比更具有差異，同時其厚度的保存也與視網膜電波圖的檢測結果相符。因此認為光誘導視網膜病變除了在視網膜外層可觀察到傷害，在視網膜

內層的部份雖然程度變化不及外層，但仍會有病理上的變化。

除此之外，在之前的研究發現，儘管在臨床上進行視網膜電波圖發現最大 b 波振幅只殘餘為正常的 20% 左右，但在組織病理學下仍有超過 50% 的椎狀細胞存活(Takahashi & Machida *et al.*, 2005)。而本研究的結果發現，大麻二酚的所有治療組別在視網膜外核層厚度的保存方面，皆可以達到正常的 70%~80% 左右，比起治療對照組具有相當良好的保護效果；在感光細胞層方面，除了 5 mg/kg/ day 連續給予四次的這組以外，保存的程度也高達 70%~90% 左右，與之前的研究相符合。這個結果也再一次證明視網膜電波圖相較於組織病理的變化來進行視網膜的檢查，是更為敏感的檢測工具。

#### B. 視網膜型態之評估

在視網膜的型態方面，本研究結果發現外核層的細胞排列會依照傷害程度不一而出現疏鬆且凌亂的現象。其中值得注意的，在部分治療對照組或是治療效果較差的個體中，雖然其外核層的整體厚度沒有非常明顯的變薄，但是相較於其他治療組別來說，外核層內部的細胞排列非常鬆散。因此在進行評估時，應該要同時評估視網膜的厚度以及型態上的變化，才不會有錯誤的判讀。

除此之外，之前文獻提到光照誘導的視網膜損傷，並非是整區的視網膜皆有相同的傷害，相較之下，視神經以上 (superior) 的區域傷害程度比起視神經以下 (inferior) 的區域嚴重，其中特別以視網膜的中央，視神經上方約莫 1.5 公厘處為對光照形成傷害最敏感的區域(Sygawara *et al.*, 1998)。而在本實驗中，不論是有無給藥的組別，組織病理學檢查下皆有類似的發現。

### 第 3-3 節 微膠細胞之結果討論

微膠細胞為中樞神經系統中主要的單核吞噬細胞，也同時存在於視網膜的部份，就像其他位於中樞神經系統中的膠細胞 (glia cells) 一樣具有免疫抵抗的功能。一般認為微膠細胞在發育中的視網膜的神經節細胞層 (ganglion cell layer) 以及內核層中，扮演吞噬或是清除凋亡的神經細胞的角色。除此之外，研究中發現在中樞神經系統早期發育過程中，微膠細胞也具有啟動細胞死亡的功能(Lobov *et al.*, 2005)。

一般正常狀態下，位於視網膜內的微膠細胞會處於休息態，並受到其他神經細胞產生的細胞激素調控，藉以維持平衡的視網膜免疫調節功能，同時具有神經保護以及組織再生的功能，如圖 5-1 所示。當眼內受到像是感染、神經損傷、缺血或是代謝性的轉變等刺激時，便會促使微膠細胞活化，受到活化的微膠細胞會分泌具有溶解或是與細胞膜接合的細胞激素，包括 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  以及活性氧分子等，藉以調節組織修復，以及持續免疫反應進行的功能。近年來對於神經病變中微膠細胞活化所代表的意義有巨大的轉變，在過往通常只把微膠細胞當作神經細胞在退化過程中的一個旁觀者角色；但現在認為在許多疾病中，活化的微膠細胞會因為產生過多的細胞激素，因而造成持續的炎症反應而使病變更為嚴重，甚至造成組織的損傷或是誘發神經細胞的凋亡，這個現象同時也在視網膜萎縮 (retinal dystrophies) 疾病中被發現(Schuetz & Thanos *et al.*, 2004)。之前的文獻發現，在視網膜退化的小鼠模式中，微膠細胞會增生並且往視網膜的外核層遷移(Zeiss & Johnson *et al.*, 2004)，部分研究認為活化的微膠細胞會產生大量內源性大麻生物鹼 (endogenous cannabinoids)，約是其他的神經元產生量的 20 倍以上，這些內源性大麻生物鹼可能就是引起活化的微膠細胞遷移至病灶處並蓄積的原因(Walter *et al.*, 2003)。除此之外，Ng 等人也發現，在光誘導視網膜退化的白化鼠

(albino) 品系中，微膠細胞不只會遷移到外核層、感光細胞層中間的位置，同時也會在視網膜下靠近色素上皮的地方出現，被認為具有協助色素上皮來減少過多光照產生的毒性，但這個現象在色素化的老鼠品系則沒有被發現，這可能與白化鼠其色素上皮對於光照較無抵抗力有關(Ng & Streilein *et al.*, 2001)。對照於本研究的結果也可以發現，在未受光照傷害的正常大鼠視網膜，不會有微膠細胞表現於外層的部位；而在光照傷害之後，會依照時間不同而有不同數量的微膠細胞表現於視網膜的外層以及視網膜下層的部位，證明在光誘導視網膜病變的模式下，確實會有微膠細胞的參與。

除此之外，Liou 等人經由體外實驗證實在視網膜的微膠細胞中含有大量的腺核苷的受器，腺核苷受器共分為四個亞型，包括 A1、A2A、A2B、以及 A3，其中 A2A 被證實是腺核苷在炎症反應產生調控以及抑制 TNF- $\alpha$  產生的最主要受體，而在微膠細胞中的腺核苷受器又以 A2A 數量最多。因此推測大麻二酚之所以在炎症性視網膜疾病中具有神經保護的效果，最主要是因為提升內源性的腺核苷，並與活化的微膠細胞內含有的腺核苷受器形成作用，進一步達到減緩炎症反應的結果(Liou *et al.*, 2008)。對照於本研究的結果可以發現，經由大麻二酚 5、10 mg/ kg/ day 治療的組別不管是在 24 小時還是 48 小時的時間點，比起治療對照組都有顯著的抑制微膠細胞活化的作用，在第 72 小時雖然沒有顯著的差異，但整體的個數也較治療對照組來的少，證實了大麻二酚具有抑制微膠細胞活化的功能。然而是否經由抑制微膠細胞的活化，進一步達到抗發炎以及抗細胞凋亡的效果，進而具有保護視網膜的感光細胞，還需要進一步的評估才能得知。

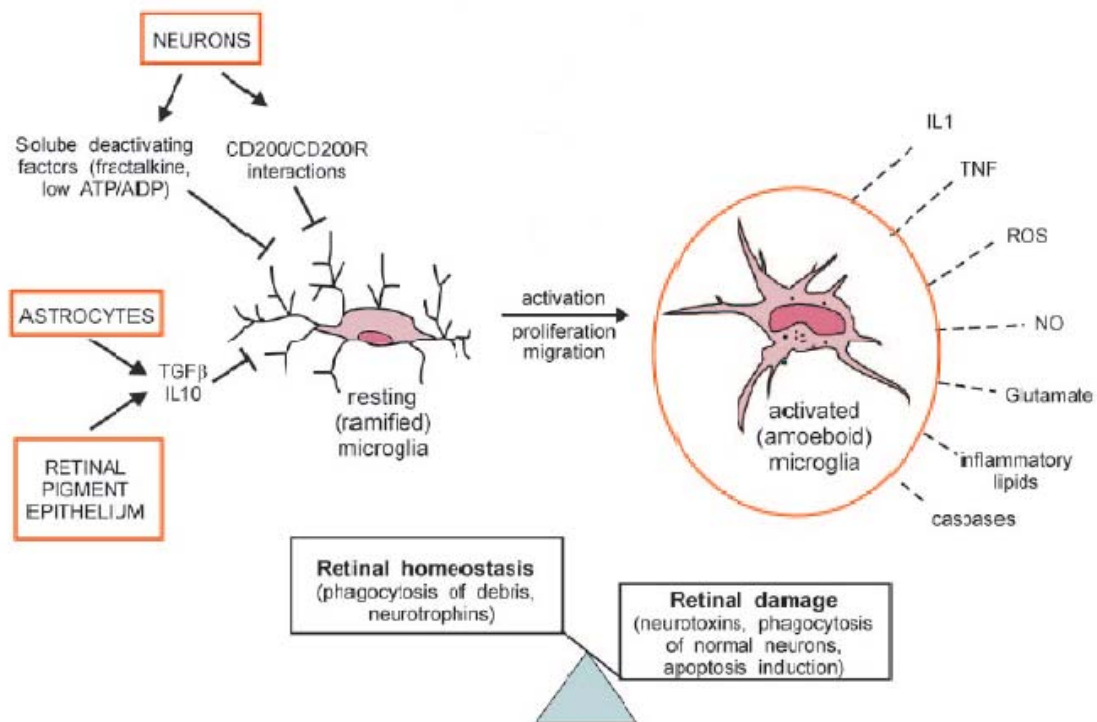


圖 5-1. 微膠細胞靜止狀態與活化狀態的關係圖。

正常狀態下微膠細胞會處於休息態，並受到其他神經細胞產生的細胞激素調控，藉以維持平衡；當眼內受到像是感染、神經損傷、缺血或是代謝性的轉變等刺激時，便會促使微膠細胞活化且增生，並且分泌許多具生物活性的物質來協助組織修復。但是若有慢性的刺激微膠細胞活化的情況，則會造成視網膜的傷害以及神經元的凋亡。(Langmann *et al.*, 2007)

### 第 3-4 節 藥物投與方式之討論

本研究中所有的藥物皆採取腹腔注射的全身性投藥，因此除了藥物本身的效果以外，也必須考量到全身投藥可以分佈到視網膜的多寡。自 1953 年起，研究逐漸發現在眼睛的前房以及後房皆存在著類似血腦障壁的構造，因此慢慢有了血眼障壁 (blood-ocular barrier) 的概念。一般來說在眼睛主要分為兩個障壁系統，藉此調控內部的液體以及保護眼內的組織，同時維持一個良好的環境來使視覺細胞功能得以順利運轉：其一



為介於血液以及眼前房液的障壁，稱為 blood-aqueous barrier；另一則負責掌控視網膜的恆定、調控視網膜視覺細胞的細微環境，稱為 blood-retina barrier (Cunha-Vaz *et al.*, 1997)。其中 blood-retina barrier 是經由許多複雜的細胞組織而成，主要分為外層以及內層，外層為視網膜色素上皮形成；內層則由視網膜微血管的內皮細胞所形成。其中視網膜微血管的內皮細胞具有很緊密的細胞間隙，而這現象只存在於視網膜以及腦部的血管，藉由緊密的細胞間隙可以減少細胞周邊親水性物質的穿過，除了減少有害物質的進入，也可能阻隔來自全身血液循環的藥物擴散到視網膜。

因此利用全身性投藥的方式在治療視網膜方面的疾病時，藥物要進入到視網膜，必須可以穿透 blood-retina barrier 並且達到足夠的藥量才有辦法達到好的治療成效，這之間又包含藥物在血液中的濃度、分佈的體積、藥物代謝的速率、與血漿中蛋白質結合率，以及相對之下對於 blood-retina barrier 有較佳穿透力的藥物(Cunha-Vaz *et al.*, 2004)。同理，若是利用局部點眼的方式，也會因為藥物要穿透前房的速度很慢，並且會降低達到後房時藥物的劑量，因此在做治療視網膜方面的疾病是不適合的(Gelatt *et al.*, 2007)。而本研究中使用來對照的 minocycline 不但具有良好的親脂性，在之前的研究也指出 minocycline 具有良好的血腦障蔽穿透力，在腦中的濃度約可達到血清中的 50%(Smith *et al.*, 2003)，可能因此造成兩個藥物保護效果的差異性。

為了使藥物更有效率的達到預期的視網膜部份，並且減少全身投藥可能產生的副作用，Cunha-Vaz 提出幾個改變投藥的策略來提升治療的成效：(Cunha-Vaz *et al.*, 1997)

1. 改善 blood-retina barrier 的穿透力：藉由靜脈給予一個高張的溶液，例如 mannitol，使視網膜血管壁的內皮細胞皺縮，因而讓細胞間隙增大。

但這種非特異性的方式可能造成中樞神經系統也因為相同作用而造成不好的效果。除了藥物之外，藉由放射線治療也可以增加穿透力，目前已經證實在白光以及藍光之下會使 blood-retina barrier 的穿透力增加。

2. 化學性的改善藥物對於障壁的穿透力：合成為較具脂溶性的相似物 (analogues) 來藉此提升對 blood-retina barrier 的穿透力。除此之外也可以藉由特殊的載體系統來增加通過 blood-retina barrier 的可能性。

3. 以脂質體 (liposome) 為載體的膠囊型式：藉由脂質體的保護來增加藥物穿透的機會，但是利用這個方式的缺點為，脂質體容易被肝臟、肺臟、以及脾臟快速的吸收。

除此之外，直接將藥物投予至玻璃體可以使藥物更有效的進入眼睛的後房，並且在此處達到有效濃度，目前在人醫已經廣泛的利用這種給藥方式來做眼球後房疾病的治療(Jonas & Söfker *et al.*, 2001)。在狗，目前臨床上的使用方式為利用微量注射器給予 0.05-0.10 毫升的溶液(Raju & Weinberg *et al.*, 2002)。但是藉由玻璃體內注射給藥，必須同時考慮藥物的安全性，以及注射後達到視網膜的濃度。藥物投予至玻璃體內之後，除了藉由眼前房的途徑作排除以外，亦會經由視網膜的啣筒系統，以主動運輸的方式將藥物排除至全身血液循環中，而通過視網膜的這個動作會因為藥物不同的分子量而有不同的半衰期，此外若有感染、發炎的狀況，或是藥物本身的脂溶性等皆會影響半衰期的長短。因此為了達到更長的藥物效果，過去十幾年不斷的研究可以協助植入的裝置，例如脂質體或是微球體 (microsphere)，來使藥物可以在眼內達到持續的釋出，另外也可以減少藥物的毒性以及達到更好的臨床治療效果(Gelatt *et al.*, 2007)。然而由於大麻二酚晶體在配置成注射性的藥物時，需要 100% 的酒精來做溶劑，雖然在注射前會經過稀釋的動作，但是仍有可能因為酒精造成眼內組織或是神經上的傷害，因此利用玻璃體內注射的方法目前不可進行，之前的文獻提

到使用大麻二酚於實驗動物的給予方法，目前仍是以腹腔內注射以及靜脈注射為主，少部分以口服的方式仍達到預期的效果。若有其他適合的溶劑，未來也許以玻璃體內注射的方法，可以作為治療視網膜內疾病新的給藥方式。

### 第3-5節 大麻二酚之神經保護效果討論

在本研究中，利用光誘導造成感光細胞的凋亡的大鼠模式來評估給予大麻二酚的神經保護效果，評估的方式包括以視網膜電波圖的檢測來評估視網膜的功能性，同時觀察組織病理上的變化。而在本研究的結果發現，雖然在視網膜電波圖以及組織病理的結果比起另一個藥物 minocycline 表現較差，但是相較於治療對照組都有顯著的差異，代表大麻二酚仍具有一定程度的神經保護效果。

除此之外我們研究結果也發現，不同的濃度以及不同的給藥次數，皆會影響神經保護的結果。代表以大麻二酚作為神經傷害的治療藥物時，需要適合的濃度以及給予方式才可以達到良好的效果。這個結果有可能與大麻二酚具有的其他效果，例如免疫抑制或是促進細胞凋亡的功能相關。到目前為止仍有不少的研究提出給予大麻二酚之後，會造成與濃度成正相關的促進細胞凋亡結果，雖然到目前為止的機制還尚未清楚，初步認為與 caspase 的活化有相關性，目前也利用此特性作為抗癌的治療研究(Gallily *et al.*, 2003; Ligresti *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007)。

另外本實驗的結果也證實大麻二酚抑制微膠細胞活化的結果，由於微膠細胞在光誘導感光細胞凋亡的過程中扮演重要的角色，若過度的活化反而可能造成進一步的神經損傷，因此推測大麻二酚在此模式下達到神經保護的結果，可能是藉由抑制微膠細胞活化的機制，進一步減緩感光細胞的死亡。

## 第六章 結論

遺傳性視網膜退化症無論在人還是犬隻，到目前為止尚未有有效的方式可以治癒，近年來的研究也發現主要是因為視網膜感光細胞凋亡所造成的。本研究利用光照曝露的方式，藉以誘導 Sprague-Dawley 大鼠的視網膜病變，以建立視網膜感光細胞凋亡的動物模式，來模仿遺傳性視網膜退化症的病變，同時利用此動物模式進行嘗試性的藥物治療，以供未來臨床治療上的另一考量。

在本研究中選擇的藥物大麻二酚 (cannabidiol; CBD) 在之前的研究中曾被指出具有抗氧化、抗發炎、以及神經保護的效果，同時選擇曾在相同模式下被發表具有神經保護效果的 minocycline 來做比較。在研究中嘗試將大麻二酚濃度定量，同時利用視網膜電波圖以及組織病理的型態變化來評估其具有的神經保護效果，此外進一步探討大麻二酚與微膠細胞的活化關係，藉此確認大麻二酚可能的機制。在整體的評估之下，發現大麻二酚雖然無論是在視網膜電波圖或是組織病理上的保護效果皆較 minocycline 差，但比起治療對照組仍有顯著差異，因此認為大麻二酚仍具有中等程度的神經保護效果。但在臨床上對於視力的實際保護效力仍未知，未來還需要更進一步的評估。同時在本研究結果中僅初步發現較有保護效果的濃度，未來或許還可以嘗試不同的給藥方式以及給藥的時間點，或許會有更適合的方式來達到更佳的神經保護作用。

除此之外大麻二酚在過去的研究中，常被提到是以抗氧化的功能而達到神經保護的效果，而在本研究的結果顯示，大麻二酚在光誘導視網膜神經細胞凋亡的模式下，可以抑制微膠細胞的活化，同時具有神經保護的效果。是否大麻二酚是因為抑制微膠細胞活化，進一步減緩發炎前驅物質的產生而達到神經保護，這部份還需要進一步的檢測發炎前驅物質的變化才能有定論。

## 第七章 參考文獻

- Abler A, Chang C. (1996). Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **92**, 177-189.
- Amar MB. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology* **105**, 1-25.
- Baptiste DC, Hartwick ATE, Jollimore CAB. (2004). An investigation of the neuroprotective effects of tetracycline derivatives in experimental models of retinal cell death. *Molecular Pharmacology* **66**, 1113-1122.
- Braida D, Pegorinia S, Arcidiacono MV. (2003). Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neuroscience Letters* **346**, 61-64.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM. (2002). Targeting leukocyte MMPs and transmigration minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* **125**, 1297-1308.
- Cicerone C. (1976). Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. *Science* **194**, 1183-1185.
- Costa B, Colleoni M, Conti S. (2004). Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **369**, 294-299.
- Cunha-Vaz JG. (1997). The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Documenta Ophthalmologica* **93**, 149-157.
- Cunha-Vaz JG. (2004). The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Experimental Eye Research* **78**, 715-721.
- El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y. (2006). Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *American Journal of Pathology* **168**, 235-244.
- El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S. (2003). Neuroprotective effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-Methyl-D-Aspartate-induced retinal neurotoxicity. *American Journal of Pathology* **163**, 1997-2008.
- El-Remessy AB, Tang Y, Zhu G. (2008). Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation. *Molecular Vision* **14**, 2190-2203.
- Elewa HF, Hilali H, Hess DC. (2006). Minocycline for short-term neuroprotection. *Pharmacotherapy* **26**, 515-521.

- Gallily R, Even-chen T, Katzavian G. (2003). Gamma-irradiation enhances apoptosis induced by cannabidiol, a non-psychotropic cannabinoid, in cultured HL-60 myeloblastic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma* **44**, 1767-1773.
- Gebicke-Haerter PJ. (2001). Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microscopy Research and Technique* **54**, 47-58.
- Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ. (2002). DNA damage and repair in light-Induced photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **43**, 3511-3521.
- Grimm C, Wenzel A, Williams TP. (2001). Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **42**, 497-505.
- Hampson AJ, M.Grimaldi, J.Axelrod. (1998). Cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 8268-8273.
- Hao W, Wenzel A, Obin MS. (2002). Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nature Genetics* **32**, 254-260.
- Hayakawa K, Mishima K, Abe K. (2004). Cannabidiol prevents infarction via the non-CB1 cannabinoid receptor mechanism. *Neuropharmacology and Neurotoxicology* **15**, 2381-2385.
- Jonas JB, Söfker A. (2001). Intraocular injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of diabetic macular edema. *American Journal of Ophthalmology* **132**, 425-427.
- Karniol IG, Carlini EA. (1973). Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia* **33**, 53-70.
- Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS. (2002). Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 6328-6333.
- Kima H-S, Suha Y-H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behavioural Brain Research* **196**, 168-179.
- Langmann T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1345-1350.
- Lawwill T. (1973). Effects of prolonged exposure of rabbit retina to low-intensity light. *Investigative Ophthalmology* **12**, 45-51.
- Leung DW, Lindlief LA, Laabich A. (2007). Minocycline protects photoreceptors from light and oxidative stress in primary bovine retinal cell culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48**, 412-421.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids

- with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **318**, 1375-1387.
- Liou GI, Auchampac J, Hillard CJ. (2008). Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **49**, 5526-5531.
- Lobov IB, Rao S, Carroll TJ. (2005). WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* **437**, 417-421.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 9561-9566.
- McGeer PL, McGeer EG. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* **21**, 195-218.
- McMahon SB, Cafferty WBJ, Marchand F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental Neurology* **192**, 444-462.
- Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology* **42**, 11S-19S.
- Mechoulam R, Peters M. (2007). Cannabidiol – recent advances. *Chemistry & Biodiversity* **4**, 1678-1692.
- Moriya M, Baker BN, Williams TP. (1986). Progression and reversibility of early light-induced alterations in rat retinal rods. *Cell and Tissue Research* **246**, 607-621.
- Narfstrom K, Ekesten B, Rosolen SG. (2002). Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Documenta Ophthalmologica* **105**, 83-92.
- Ng TF, Streilein JW. (2001). Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **42**, 3301-3310.
- Ni Y-q. (2008). Neuroprotective effects of naloxone against light-induced photoreceptor degeneration through inhibiting retinal microglial activation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **49**, 2589-2598.
- Noell WK. (1966). Retinal damage by light in rats. *Investigative ophthalmology* **5**, 450-473.
- Norren DV, Schellekens P. (1990). Blue light hazard in rat. *Vision Research* **30**, 1517-1520.
- Ofri R. (2007). Optics and physiology of vision. In: Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology*. 4<sup>th</sup> ed. Blackwell, 183-219.

- Ofri R. (2008). Retina. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 4<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier, 285-317.
- O'Steen W, Anderson K. (1972). Photoreceptor degeneration after exposure of rats to incandescent illumination. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **127**, 306-313.
- O'Steen WK, Anderson KV, Shear CR. (1974). Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Investigative Ophthalmology* **13**, 334-339.
- O'Steen WK, CR S, KV A. (1972). Retinal damage after prolonged exposure to visible light. A light and electron microscopic study. *The American Journal of Anatomy* **134**, 5-21.
- Ohlsson M, Westerlund U, Langmoen IA. (2004). Methylprednisolone treatment does not influence axonal regeneration or degeneration following optic nerve injury in the adult rat. *Journal of Neuro-Ophthalmology* **24**, 11-18.
- Organisciak DT, Jiang Y-L, Wang H-M. (1989). Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **30**, 795-805.
- Petersen-Jones S. (2005). Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *Journal of Small Animal Practice* **46**, 371-380.
- Petersen-Jones SM. (1998). A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies. *The Veterinary Journal* **155**, 5-18.
- Raju JR, Weinberg DV. (2002). Accuracy and precision of intraocular injection volume. *American Journal of Ophthalmology* **133**, 564-566.
- Russo E, Guy GW. (2006). A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses* **66**, 234-246.
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A. (2005). The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Neuroimmunology* **159**, 97-105.
- Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M. (2001). Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* **48**, 1399-1401.
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S. (2008). Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Molecular Neurobiology* **38**, 253-269.
- Schuetz E, Thanos S. (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Current Drug Targets* **5**, 619-627.
- Scuderi C, Filippis DD, Iuvone T. (2009). Cannabidiol in medicine a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytotherapy Research* **23**, 597-602



- Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA. (2000). Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from *in vitro* ischemia in rats. *Neuroscience Letters* **278**, 157-160.
- Slivka AP, Murphy EJ. (2001). High-dose methylprednisolone treatment in experimental focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* **167**, 166-172.
- Smith DL, Woodman B, Mahal A. (2003). Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. *Annals of Neurology* **54**, 186-196.
- Souied EH, Reid SNM, Piri NI. (2008). Non-invasive gene transfer by iontophoresis for therapy of an inherited retinal degeneration. *Experimental Eye Research* **87**, 168-175.
- Specht S, Leffak M, Darrow RM. (1999). Damage to rat retinal DNA induced *in vivo* by visible light. *Photochemistry and Photobiology* **69**, 91-98.
- Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD. (2005). Minocycline as a neuroprotective agent. *The Neuroscientist* **11**, 308-322.
- Sugawara T, Sieving PA, Bush RA. (2000). Quantitative relationship of the scotopic and photopic ERG to photoreceptor cell loss in light damaged rats. *Experimental Eye Research* **70**, 693-705.
- Sygawara T, Sieving PA, Iuvone M. (1998). The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **39**, 2458-2465.
- Takahashi T, Machida S. (2005). Functional changes in rod and cone pathways after photoreceptor loss in light-damaged rats. *Current Eye Research* **30**, 703-713.
- Thomas A, Baillie G, Phillips A. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* **150**, 613-623.
- Walter L, Franklin A, Witting A. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *The Journal of Neuroscience* **23**, 1398-1405.
- Watanabe K, Kayano Y, Matsunaga T. (1996). Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **19**, 1109-1111.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **24**, 275-306.
- Wu H-Y, Chu R-M, Wang C-C. (2007). Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicology and Applied Pharmacology* **226**, 260-270.
- Wu J. (2006). Photochemical damage of the retina. *Survey of Ophthalmology* **51**, 461-481.
- Yang L-p, Zhu X-a, O.M.Tso M. (2007). A possible mechanism of

- microglia-photoreceptor crosstalk. *Molecular Vision* **13**, 2048-2057.
- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Neurobiology* **95**, 15769-15774.
- Zeiss CJ, Johnson EA. (2004). Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **45**, 971-976.
- Zemke D, Majid A. (2004). The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clinical Neuropharmacology* **27**, 293-298.
- Zhang C, Lei B. (2004). Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **45**, 2753-2759.
- Zhang C, Shen J-k, Lam TT. (2005). Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Molecular Vision* **27**, 887-895.
- Zhang Q, Chen C, Lü J. (2009). Cell cycle inhibition attenuates microglial proliferation and production of IL-1, MIP-1, and NO after focal cerebral ischemia in the rat. *Glia* **57**, 908-920.

